ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA

microbiologia generalis,
agrobiologica et technica

Vol. X No 4

1 9 6 1

PAN
M M

COMMONWEALTH BUREAU

24 APR 1962

PRZEPISY AUTORSKIE

Jako materiał publikacyjny mogą być nadsyłane rozprawy i komunikaty dotyczące prac oryginalnych z dziedziny mikrobiologii ogólnej, rolniczej i przemysłowej, nigdzie dotychczas nie publikowane, a referowane uprzednio na posiedzeniu Oddziału Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów lub innego towarzystwa naukowego. Czasopismo zamieszcza również referaty przeglądowe.

Jednostronne maszynopisy o podwójnych odstępach, z marginesem 4 cm należy przesyłać w 2 egz. na ręce sekretarza: Redakcja „*Acta Microbiologica Polonica*", Warszawa, Nowy Świat 67.

Do prac pisanych po polsku należy dołączyć streszczenie rosyjskie, angielskie, francuskie lub niemieckie. Streszczenia powinny zawierać zasadnicze konkluzje pracy i nie powinny przekraczać 15% tekstu. Prace w obcym języku (rosyjski, angielski, francuski lub niemiecki) muszą być uprzednio akceptowane przez tłumacza Redakcji; należy do nich dołączyć wersję polską i streszczenie w języku polskim. Każda praca powinna być zaopatrzona w tytuł w języku polskim oraz streszczenia, nazwisko i inicjały autora (ów), nazwę i adres zakładu, w którym wykonano pracę.

Pożądany jest następujący układ prac: a) krótki wstęp, b) metody badania, c) wyniki, d) dyskusja i wnioski, e) krótkie streszczenie w języku polskim — nie więcej niż 3% tekstu, f) piśmiennictwo, g) streszczenie obcojęzyczne.

Prace należy ujmować treściwie, wstęp powinien zawierać tylko dane bezpośrednio odnoszące się do opracowanego tematu; metody należy opisać krótko: tam gdzie to możliwe powoływać się na oryginalne opisy metod.

Wyniki mogą być ilustrowane tablicami i wykresami, należy jednak unikać tablic i wykresów dla przedstawienia tych samych danych. Wykresy i tablice powinny być możliwie przejrzyste i nieskomplikowane i ilustrować zasadnicze, istotne wyniki. Rysunki i wykresy można dostarczać w czytelnych szkicach ołówkowych na brystolu, każdy na oddzielnej kartce, zaopatrzonej na odwrocie w wypisane ołówkiem: tytuł pracy, nazwisko autora oraz numer rysunku lub wykresu. Objaśnienia do rysunków i wykresów należy dołączyć na osobnej kartce z wyraźnym zaznaczeniem numeru rysunku (wykresu). W objaśnieniach należy podawać skalę lub wielokrotność powiększenia. Fotografie powinny być kontrastowe, na matowym papierze. Ilość tablic i rysunków musi być ograniczona do minimum.

W maszynopisie należy zaznaczyć miejsce, w którym ma być umieszczony rysunek (wykres, fotografia).

Przy powoływaniu się na piśmiennictwo należy podać nazwiska autorów i rok publikacji, np. Prażmowski (1879) lub (Prażmowski 1879). Jeżeli praca cytuje więcej niż jedną publikację danego autora z tego samego roku, należy to uwidocznić dodając małe litery (np. 1887 a, 1887 b itd.).

Wykaz cytowanych prac (piśmiennictwo) powinien być sporządzony w układzie alfabetycznym i powinien zawierać następujące elementy: nazwisko i inicjały autora (ów), kropka, rok, dwukropek, tytuł pracy, nazwa czasopisma w przyjętych skrótach, tom (ewentualnie zeszyt), stronica czasopisma; w wypadku cytowania książki: nazwisko i inicjały autora (ów), rok wydania, tytuł książki, wydanie, miejsce i wydawca, ewentualnie stronica tekstu.

W tekście i tablicach należy stosować przyjęte skróty, np. ml — a nie ccm, g — a nie gr, 100° — a nie 100°C, M — molarny, N — normalny itd.

Przy opisie roztworów należy rozróżnić „%" — g na 100 g roztworu, „% objętościowy" — ml na 100 ml roztworu, „stężenie procentowe" — g na 100 ml rozpuszczalnika.

Nazwy drobnoustrojów należy podawać w brzmieniu łacińskim, przy pierwszym wzmiankowaniu — w pełnym brzmieniu. Dopuszczalne jest również jednoczesne podawanie przyjętych ogólnie nazw polskich. W dalszym tekście nazwy rodzajowe (nie gatunkowe) należy skracać lub podawać tylko nazwy polskie.

Autor otrzymuje 25 odbitek bezpłatnie, 75 odbitek nie zszywanych — po cenie zryczałtowanej (około 2 zł za stronę druku).

* * *

Zgodnie z poleceniem Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów, w przyszłości prace oryginalne będą publikowane w jednym z języków kongresowych.

Zmiana ta będzie stopniowo wprowadzana w życie już w 1962 r.

W związku z powyższym objętość prac zostanie ograniczona do maksimum 1 arkusza wydawniczego. Prace mogą być nadsyłane w wersji polskiej z załączonym słownikiem stosowanych terminów fachowych w języku publikacji. Tłumaczenie w takim przypadku wykona Redakcja na koszt autora. Prace przygotowane w wersji obcej muszą uprzednio uzyskać akceptację jednego z tłumaczów Redakcji. Do wersji obcej należy dołączyć 1 egzemplarz w wersji polskiej.

POLSKIE TOWARZYSTWO MIKROBIOLOGÓW
SEKCJA MIKROBIOLOGII OGÓLNEJ, ROLNICZEJ I PRZEMYSŁOWEJ

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA

microbiologia generalis,
agrobiologica et technica

Vol. X No 4

1961

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE

RADA REDAKCYJNA

Przewodniczący: Jadwiga Ziemięcka, członek rzeczywisty PAN — Lublin, Józef Heller, członek rzeczywisty PAN — Warszawa, Jadwiga Jakubowska — Łódź, Aniela Kozłowska — Kraków, Władysław Kunicki-Goldfinger — Warszawa, Eugeniusz Pijanowski, członek rzeczywisty PAN — Warszawa, Feliks Przesmycki — Warszawa

KOMITET REDAKCYJNY

Redaktor naczelny — Władysław Kunicki-Goldfinger
Dział rolny — J. Gołębiowska, Poznań
Dział przemysłowy — J. Jakubowska, Łódź i S. Bujak, Lublin

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE
ODDZIAŁ WROCŁAWSKI

Nakład 1082+138 egz.	Oddano do składania 2. IX. 1961 r.
Ark. wyd. 12,75, ark. druk. 9,5	Podpisano do druku 13. XII. 1961 r.
Papier druk. sat. kl. III, 80 g 70×100	Druk ukończono w grudniu 1961 r.
Cena zł. 25,–	Nr zam. 226/61. T-6.

WROCŁAWSKA DRUKARNIA NAUKOWA

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1961, 10 : 351 - 370

Janina Horodko, Ligia Krassowska, Krzysztof Naimski i Kazimierz Zakrzewski

CIĄGŁA HODOWLA *SALMONELLA TYPHI* DLA PRODUKCJI SZCZEPIONKI PRZECIWDUROWEJ

Z Centralnego Laboratorium Zjednoczenia Wytwórni Surowic i Szczepionek „Biomed" w Warszawie

Wpłynęło dnia 15 grudnia 1960 r.

Streszczenie

Przedstawiono wyniki badań nad hodowlą ciągłą *S. typhi* i wartością immunogenną otrzymanych z tej hodowli szczepionek.

S. typhi Nr *243* hodowano, w odpowiedniej aparaturze, na enzymatycznym hydrolizacie kazeiny wzbogaconym glikozą i solami nieorganicznymi, uzyskując maksymalny wzrost $1{,}8 \times 10^{10}$ bakterii/ml.

Antygenowość szczepu nie uległa istotnym zmianom w czasie hodowli. Przygotowane w ten sposób 4 rodzaje szczepionek, wykazały wskaźniki skuteczności w granicach 12,8-95,4.

Szybko rosnące zapotrzebowanie na masę bakteryjną, czy to dla produkcji szczepionek, czy też dla celów badawczych, sprawiło, że od dawna już klasyczne metody hodowli laboratoryjnej zastępowano metodami zbliżonymi do stosowanych w przemyśle fermentacyjnym. Drobnoustroje hoduje się w głębokich zbiornikach o dużej pojemności. Populacja bakteryjna otrzymywana w wyniku takiej hodowli, tzw. hodowli głębinowej, charakteryzuje się podobnie jak każda hodowla laboratoryjna tym, że wiek poszczególnych drobnoustrojów jest bardzo różny. Stan taki utrudnia, a niejednokrotnie uniemożliwia badanie metabolizmu drobnoustrojów w poszczególnych fazach wzrostu. Warto tutaj również zaznaczyć, że zdolność uodporniająca drobnoustrojów w różnych fazach ich wzrostu nie była dotąd przedmiotem szczegółowych badań.

Od dłuższego czasu prowadzone są badania nad tzw. hodowlą ciągłą. Opisano w zasadzie dwa typy urządzeń służących do tego celu. W pierwszym, zwanym „Turbidostat", urządzenie fotoelektryczne utrzymuje stałą gęstość optyczną, pozwalając usuwać hodowlę tak

szybko, jak szybko pojawiają się nowe pokolenia bakterii. W drugim typie urządzenia („Bactogen" Monod, 1950, „Chemostat" Novick i Szilard, 1950) podłoże usuwa się z określoną szybkością, a gęstość hodowli bakteryjnej samoczynnie dostosowuje się do aktualnego zasobu czynników odżywczych. Tak więc w urządzeniu typu „Turbidostat" bakterie rozmnażają się z maksymalną szybkością, na jaką pozwala im sprawność wewnętrznych mechanizmów fizjologicznych; w urządzeniu typu „Bactogen" i „Chemostat" bakterie rozmnażają się z szybkością, na jaką im pozwala dopływ świeżego podłoża. Urządzenie typu pierwszego nie pozwala na osiągnięcie tak wysokiej koncentracji drobnoustrojów jak urządzenie typu drugiego.

Technikę hodowli ciągłej do hodowli *S. typhi* zastosowali pierwsi Formal, Baron i Spilman (1956). Użyli oni jednak podłoża tak ubogiego, że otrzymany wzrost bakteryjny był bardzo niski ($0{,}5 \times 10^9$ bakterii w ml).

Praca niniejsza, która w formie streszczenia ukazała się poprzednio (Horodko, Krassowska, Naimski, Zakrzewski, 1958) ma na celu przedstawienie warunków, w których *S. typhi* może być hodowana w sposób ciągły, zapewniający maksymalną wydajność masy bakteryjnej.

BADANIA WŁASNE

Aparatura. Wszystkie badania wykonywano posługując się aparaturą umożliwiającą ciągłe mieszanie i przewietrzanie hodowli, pomiary *pH*, dodawanie niezbędnych odczynników w warunkach jałowych oraz wymianę podłoża z dowolnie regulowaną szybkością. Schemat aparatury przedstawiono na rys. 1.

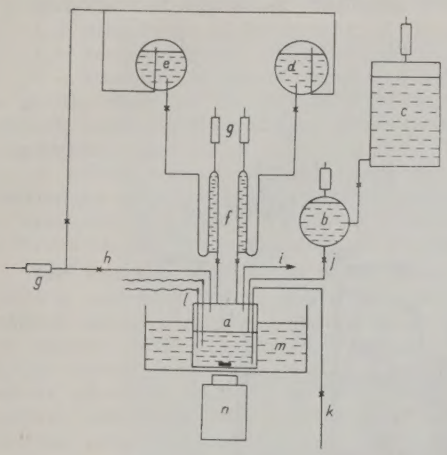
W kolbie *a* (czteroszyjna kolba sulfonacyjna) o pojemności 2,5 l, prowadzi się hodowlę bakterii. Kolba jest umieszczona w łaźni wodnej *m*, ogrzewanej grzałkami elektrycznymi i zaopatrzonej w urządzenie do termoregulacji. Do mieszania hodowli służy mieszadło elektromagnetyczne *n*. Powietrze, doprowadzane pod ciśnieniem, przechodzi przez filtr wyjaławiający *g* (napełniony watą szklaną) i przewodem *h* dopływa do kolby *a*, skąd uchodzi rurką *i*. Dwie biurety *f* są połączone: jedna ze zbiornikiem roztworu wodorotlenku sodu *d*, druga ze zbiornikiem roztworu glikozy *e*. Obie napełniane są przez wytworzenie w zbiornikach z roztworami niewielkiego nadciśnienia jałowego powietrza czerpanego z przewodu *h*. Wyjaławiające filtry z waty szklanej *g* umożliwiają wyrównanie ciśnień w biuretach i zbiornikach potrzebne dla ich opróżnienia.

Układ do ciągłej wymiany podłoża jest przedstawiony szczegółowo na rys. 2. Lewar *k* służy do odciągania hodowli i jest zaopatrzony w zacisk umożliwiający regulację szybkości odpływu. Odpływ hodowli jest równoważony automatycznie dopływem świeżego podłoża z naczynia *b* o pojemności 1 l, przy czym zaciski łączące *b* ze zbiornikiem podłoża *c* i filtrem *g*, pozostają zamknięte. Ubytek podłoża w *b* uzupełnia się periodycznie ze zbiornika podłoża *c* po uprzednim zamknięciu przewodu *j*, a otwarciu pozostałych dwóch zacisków.

Zestaw aparatury jest sterylizowany jako całość z wyjątkiem zbiornika podłoża *c*, który wysterylizowany osobno dołącza się do aparatury w warunkach zapewniających jałowość.

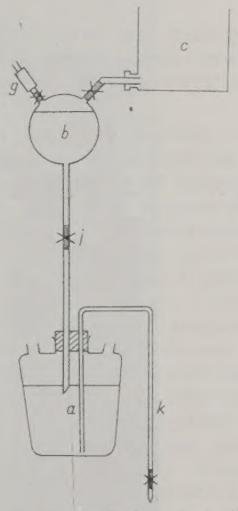
W kolbie *a* umieszczone są elektrody *l*: antymonowa (sterylizowana razem z aparaturą) i kalomelowa (wyjałowiona alkoholem i dołączona w warunkach jałowych). Elektrody są połączone z *pH*-metrem firmy Radiometr M 22, którego wskazania są zapisywane na taśmie rejestratora.

Zestaw aparatury, jakim posługiwano się, jest przedstawiony na fotografii (fot. 1).



Rys. 1. Schemat aparatury do hodowli ciągłej (objaśnienia w tekście)
Fig. 1. Diagram of the continuous culture apparatus

a — culture vessel, *b* — automatic fresh medium delivery, *c* — fresh medium container, *d* — alkali reservoir, *e* — glucose reservoir, *f* — burettes, *g* — glass- and cotton-wool filters, *h* — sterile air inlet, *i* — air outlet, *j* — fresh nutrient medium inlet, *k* — culture outflow, *l* — calomel and antimony electrodes, *m* — water bath, *n* — magnetic stirrer.



Rys. 2. Szczegół konstrukcji zasilania świeżym podłożem
Fig. 2. A sketch of fresh medium delivery

Szczep. We wszystkich badaniach używano szczepu *S. typhi* Nr *243* z Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie. Szczep po 18-godzinnej hodowli na agarze zwykłym w temperaturze 37° wykazuje miano aglutynacyjne: antygen *O* 1 : 640, antygen *H* 1 : 60, antygen *Vi* 1 : 40 z surowicami diagnostycznymi produkcji Krakowskiej Wytwórni Surowic i Szczepionek.

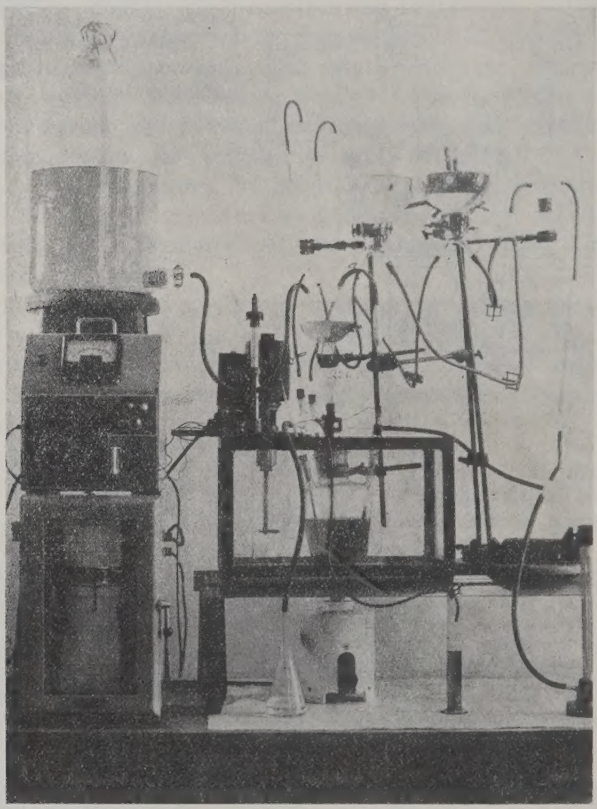
Podłoże. Drobnoustroje hodowano na podłożu o składzie:

a. sole mineralne (g/l): $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ 0,004, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0,025, KCl 0,2, KH_2PO_4 0,25, Na_2CO_3 0,4.

b. trypsynowy hydrolizat kazeiny o stosunku zawartości azotu aminowego do całkowitego około 0,5 (500 g kazeiny kwasowej zalewa się 3 l wody destylowanej i 250 ml 2 N NaOH, $pH = 9$. Następnie dodaje się 0,5 kg trzustki wołowej i trawi przez 7 dni w 37°. Produkt hydrolizy sączy się, zagotowuje i przesącza ponownie.

Podłoże zawierało sole mineralne (a) oraz hydrolizat kazeiny i glikozę w ilościach wskazanych w poszczególnych doświadczeniach. Przeważnie stężenie azotu całkowitego hydrolizatu kazeiny wynosiło 6 g/l podłoża, a glikozy 10 g/l. *pH* podłoża doprowadzano przed sterylizacją do 6,8. Sterylizowano w 117° w ciągu 20 minut.

Inoculum. Na 1 l podłoża wyjściowego używano spłuczynę w soli fizjologicznej z sześciu 18-godzinnych hodowli na zwykłych agarach skośnych.



Fotografia. 1. Zestaw aparatury do hodowli ciągłej
Photography. 1. The apparatus-set for the continuous culture

Metody. Do oznaczania glikozy stosowano metodę Fujita i Iwatake (1931), a oznaczenia całkowitej ilości bakterii dokonano metodą nefelometryczną wg krzywej kalibracyjnej sporządzonej na standardach pyreksowych. W oznaczeniu ilości żywych bakterii: autorzy posłużyli się metodą Milesa i Misra (1938), i wreszcie oznaczanie jakościowe antygenu *O*, *H*, V_i przeprowadzono metodą aglutynacji szkiełkowej z absorbowanymi surowicami diagnostycznymi.

Test aglutynacyjny Widala był wykonywany w objętości 0,25 ml odpowiedniego rozcieńczenia surowicy, do której dodawano 0,25 ml zawiesiny bakteryjnej o gęstości 2×10^9 komórek/ml. Aglutynację antygenu *H* odczytywano po inkubacji: 2 godz. w 37° i 2 godz. w temperaturze pokojowej. Miano aglutynacyjne jest wyrażane jako odwrotność rozcieńczenia surowicy, dającego aglutynację widoczną gołym okiem.

Otrzymywanie szczepionek. Stosowano 4 typy szczepionek:

1 — Szczepionka alkoholizowana (Felix, 1941)

2 — Endo-szczepionka (Ślopek, 1947)

3 — Fenolizowana pełna szczepionka bakteryjna. Do zawiesiny bakteryjnej o gęstości około 10^{10} komórek/ml dodawano fenolu do stężenia 1%; po 24 godzinach zawiesinę rozcieńczano roztworem soli fizjologicznej do gęstości 2×10^9 komórek/ml.

4 — Fenolizowana płukana szczepionka bakteryjna. Zawiesinę bakteryjną traktowano fenolem jak w metodzie 3, następnie osad bakteryjny odwirowywano i zawieszano w takiej objętości fizjologicznego roztworu soli zawierającego 0,2% fenolu, aby osiągnąć gęstość 2×10^9 komórek/ml.

Test czynnego uodpornienia myszy. Białe myszki z mieszanej populacji, wagi 16-18 g, szczepiono dwukrotnie w odstępach dwutygodniowych, wstrzykując za każdym razem podskórnie w nasadę karku 0,25 ml szczepionki (5×10^8 komórek). Po upływie dwóch tygodni od ostatniego szczepienia podawano dootrzewnowo grupie myszy uodpornionych oraz kontrolnej grupie myszy nieuodpornionych dawkę zakażającą o objętości 0,5 ml. Dawkę zakażającą przygotowano spłukując bakterie solą fizjologiczną z 18-godzinnej hodowli na agarze skośnym i przygotowując, przez rozcieńczenie roztworem soli fizjologicznej, zawiesiny o odpowiedniej gęstości. Ilość komórek bakteryjnych w 1 ml oznaczano posługując się wzorcami pyreksowymi. Zamiast mucyny stosowano wyciąg z nasion lnu (Płachcińska, 1956): 25 g nasion lnu zalewano 350 ml wody destylowanej, gotowano przez 3 minuty, sączono przez gazę i wyciąg zobojętniano 10%-owym roztworem NaOH do *pH* 7,0. Wyciąg dodawano w stosunku: 4 objętości na 1 objętość zawiesiny bakteryjnej w roztworze soli fizjologicznej. Myszki obserwowano przez 3 dni. Procent śmiertelności obliczano wg metody Reeda i Muencha (1938) i wyrażano w probitach (Weiss, 1948); wartości LD_{50} obliczano i porównywano wg Bonet-Maury, Jude, Servant (1954) i Litchfield, Wilcoxon (1949). Dla oceny wartości szczepionek obliczano tak zwany wskaźnik skuteczności szczepionki, wyrażający stosunek LD_{50} myszy uodpornionych do LD_{50} myszy nieuodpornionych.

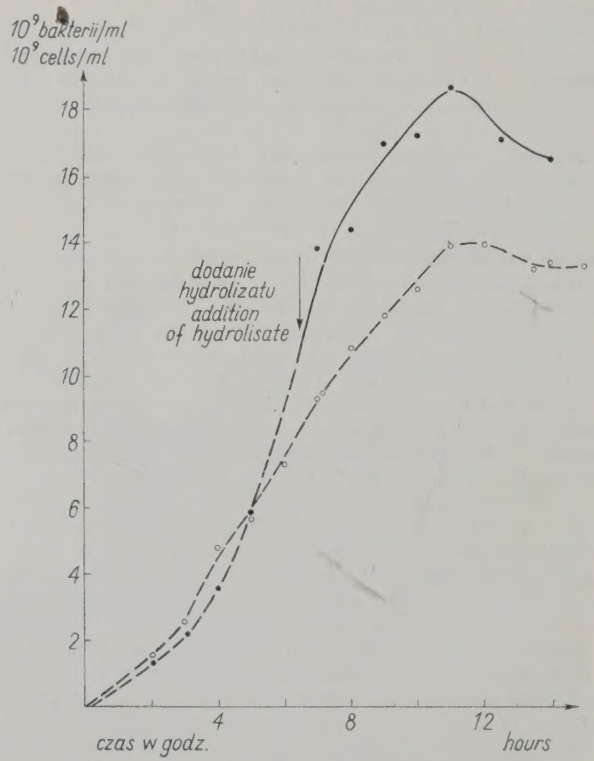
WYNIKI

HODOWLA GŁĘBINOWA

Celem ustalenia parametrów wyjściowych dla prowadzenia hodowli ciągłej przeprowadzono najpierw szereg eksperymentów, w których szczep *S. typhi* hodowano w sposób głębinowy (w aparaturze opisanej w części „Aparatura").

Wpływ stężenia składników azotowych na wzrost bakteryjny. Stosując podłoże zawierające sole mineralne oraz glikozę w ilości 10 g/l, optymalny wzrost uzyskano rozpoczynając hodowlę na podłożu o stężeniu azotu 6 mg/ml, a następnie, po osiągnięciu przez hodowlę gęstości około $0{,}7\times10^{10}$ bakterii/ml (5-7 godzina hodowli), wzbogacając podłoże

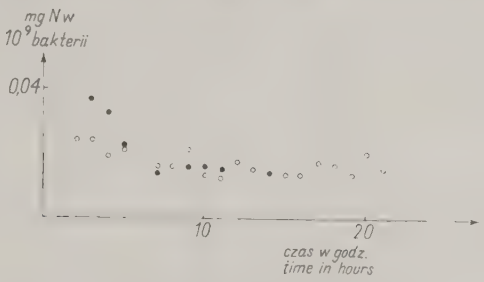
do 8 mg/ml; jak wykazano na rys. 3 poprawia to wyraźnie szybkość przyrostu masy bakteryjnej i jej ostateczną gęstość. Nadmierne zwiększanie stężenia hydrolizatu nie jest korzystne. Osiągana maksymalna gęstość hodowli (rys. 3) wynosiła około $1{,}8\times10^{10}$ komórek/ml. W żadnym z naszych eksperymentów nie udało się osiągnąć gęstości $3\text{-}4\times10^{10}$ bakterii/ml, którą podali Turowski i Kusiak (1958).



Rys. 3. Zależność wzrostu bakteryjnego od stężenia azotu w podłożu
Fig. 3. Effect of total N concentration in the medium on bacterial growth. ordinate — time of incubation, abscissa — bacterial count, ———— 8 mg N/ml, - - - - - - - 6 mg N/ml; the arrow marks the time of addition of protein hydrolisate

Celem sprawdzenia, czy miano bakteryjne oznaczone nefelometrycznie jest rzeczywiście miarą wytworzonej masy bakteryjnej, przeprowadzono oznaczanie azotu białkowego drobnoustrojów w różnych okresach wzrostu. Bakterie odwirowywano, przepłukiwano fizjologicznym roztworem soli i ekstrahowano osad na zimno 5% kwasem trójchlorooctowym. Spalano zebrany ilościowo osad, zawierający białka, kwasy nukleinowe i wielocukry bakteryjne, ale wolny od drobno-

cząsteczkowych składników azotowych i oznaczano azot metodą mikro-Kjeldahla. Wyniki dwóch takich eksperymentów przedstawiono na rys. 4. Widoczne jest, że począwszy od 6-7 godziny hodowli zachowany jest stały stosunek pomiędzy odczynem nefelometrycznym a masą azotu wielkocząsteczkowych składników ciała bakteryjnego. Wynik ten świadczy, że w badanym układzie doświadczalnym pomiar nefelo-



Rys. 4. Zawartość azotu w bakteriach w hodowli głębinowej
Fig. 4. N content in bacteria N per 10^9 cells
○ — doświadczenie experiment } 1
● — doświadczenie experiment } 2

metryczny jest miarą wytworzonej masy bakteryjnej. Brak tego rodzaju kontroli w niektórych analogicznych publikacjach uniemożliwia rozeznanie, czy uzyskana wysoka mętność hodowli jest wynikiem bardzo wysokiej masy bakteryjnej, czy też tworzących się w starej hodowli agregatów wielokomórkowych. W hodowli głębinowej szybkość rozmnażania bakterii jest funkcją czasu: w miarę starzenia się przyrost masy bakteryjnej szybko maleje.

Hodowlę ciągłą, której celem jest, podobnie jak w pracy niniejszej, osiągnięcie maksymalnej produkcji komórek bakteryjnych w jednostce czasu, należy rozpocząć w momencie, w którym hodowla osiąga maksymalną gęstość przy maksymalnej jeszcze szybkości rozmnażania. Dla ustalenia tego momentu przeprowadzono obliczenia szybkości rozmnażania bakterii w szeregu hodowli głębinowych; wyniki przedstawiono w tabeli I. Widoczne jest, że najszybszy przyrost masy bakteryjnej ma miejsce w ciągu 1-2 godzin po wzbogaceniu hodowli w hydrolizat (do 8 mg N/ml).

Wpływ stężenia glikozy na wzrost bakteryjny. Glikoza w podłożu niesyntetycznym nie jest nieodzownym źródłem węgla dla *S. typhi*. Jednak w niecbecności glikozy wzrost bakteryjny osiąga wartość zaledwie około 2×10^9 bakterii/ml. Dodanie glikozy do podłoża powoduje wzmo-

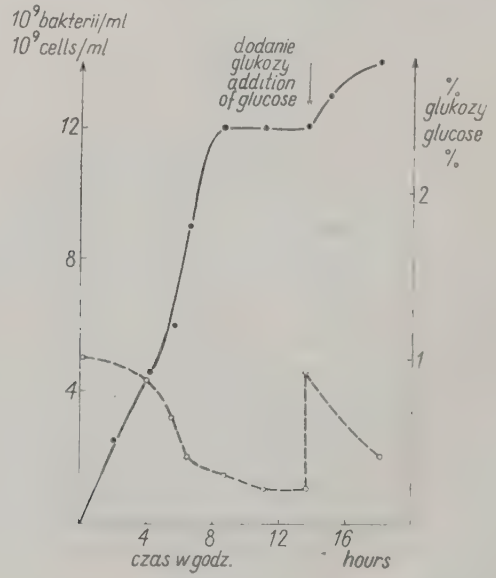
Tabela I

Bezwzględna szybkość przyrostu bakterii w hodowli głębinowej w 10^9 na 1 ml

Actual increase of bacterial count in deep culture, 10^9 per 1 ml

Godziny hodowli Hours of incubation	Nr doświadczenia Experiment No			
	1	2	3	4
2-3	0,9	—	0,6	0,8
3-4	1,4	—	1,4	1,2
4-5	2,2	3,6	2,0	1,0
5-6	4,0	1,4	2,6	1,8
6-7	4,5	1,8	2,0	1,6
7-8	0,6	5,4	4,0	1,4
8-9	2,6	1,0	2,3	0,6
9-10	0,2	0,8	—	2,8

Uwaga: linie poprzeczne w rubrykach oznaczają moment dodania hydrolizatu.
Note: dotted lines in columns show the moment of casein hydrolisate addition.

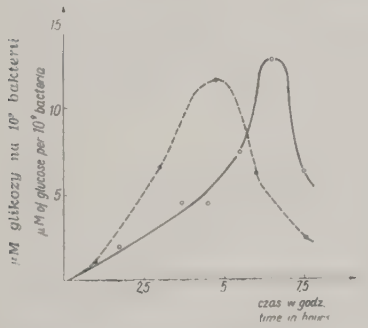


Rys. 5. Wpływ stężenia glikozy na wzrost bakteryjny.
Fig. 5. Effect of glucose concentration on bacterial growth.

○ — poziom glikozy — glucose concentration.
● — wzrost bakteryjny — bacterial count; the arrow marks the time of addition of glucose

zony wzrost bakterii, pozwalając osiągnąć 1,4-1,8×10^{10} bakterii/ml. Szybko narastająca masa bakteryjna już w czasie około 8 godzin zmniejsza zawartość glikozy w podłożu z wyjściowych 10 g/l do około 3 g/l, a przy tym jej stężeniu wzrost ulega zahamowaniu (rys. 5). Ponowne powiększenie stężenia glikozy do 10 g/l pozwala na dalsze rozmnażanie bakterii. Z doświadczeń powyższych wynika konieczność stałego uzupełniania zawartości glikozy w podłożu.

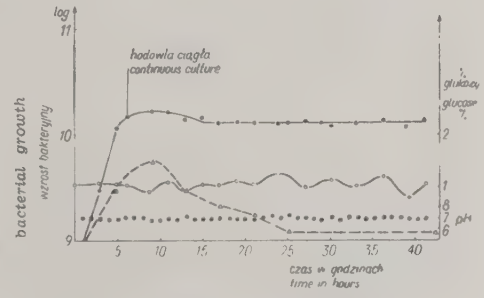
W czasie wzrostu ilość zużywanej glikozy (w przeliczeniu na 1 miliard bakterii) osiąga maksimum po około 5-7 godzinach hodowli, po czym maleje, jak to pokazano na rys. 6.



Rys. 6. Zużycie glikozy w hodowli głębinowej

Fig. 6. Glucose consumption in deep culture.

○ — doświadczenie 1
experiment 1
● — doświadczenie 2
experiment 2



Rys. 7. Przebieg hodowli ciągłej.

Fig. 7. The course of continuous culture.

● — wzrost bakteryjny — total bacterial count, ○ poziom glikozy — glucose concentration, △ — żywe miano — viable bacterial count, ■ — *pH*

Wpływ stężenia elektrolitów na wzrost. W czasie rozmnażania bakterii następuje nagromadzenie produktów przemiany materii, a wśród nich nielotnych kwasów. Ilość wytwarzanych kwasów jest szczególnie duża wówczas, gdy podłoże jest stale uzupełniane glikozą. Kwasota podłoża szybko wzrasta do *pH* 3,5, przy którym wzrost ulega zahamowaniu. Stałe wkraplanie ługu sodowego dla zobojętnienia wytwarzanych kwasów jest nieodzownym warunkiem pomyślnego przeprowadzenia hodowli.

Zastosowane w podłożu stężenie pozostałych elektrolitów — soli nieorganicznych — nie ogranicza ani szybkości wzrostu ani też maksymalnej gęstości masy bakteryjnej, osiąganej w hodowli. Nawet trzykrotne podniesienie ich stężenia nie polepsza ostatecznych wyników. Zmiana w szybkości napowietrzania hodowli od 30 do 200 l powietrza/godz/l, nie ma wpływu na wzrost bakteryjny.

HODOWLA CIĄGŁA

Hodowlę ciągłą prowadzono zgodnie z ogólną jej zasadą, sformułowaną na wstępie. Po osiągnięciu optymalnego stanu, tj. maksymalnej szybkości przyrostu bakterii przy możliwie największej gęstości hodowli, rozpoczynano w sposób ciągły usuwać hodowlę, kompensując jednocześnie jej objętość świeżym podłożem. Szybkość usuwania dobrano tak, ażeby gęstość hodowli nie uległa zmianie. Eksperymenty prowadzono wg parametrów wynikających z opisanej powyżej hodowli głębinowej. Przebieg typowej hodowli ciągłej zilustrowano graficznie na rys. 7.

Kinetyka wzrostu.

Gdy drobnoustroje rozmnażają się z szybkością nie hamowaną przez nagromadzone metabolity, niedobór czynników odżywczych itp., to szybkość przyrostu masy bakteryjnej określa wzór:

$$\frac{dB_t}{dT} = kB_{\dot{z}} \tag{1}$$

w którym $B_{\dot{z}}$ oznacza ilość żywych bakterii w zbiorniku hodowlanym, B_t — całkowitą ilość bakterii: bakterie w zbiorniku i bakterie odciągnięte, T — czas, k — współczynnik szybkości.

Jeżeli z takiej hodowli, prowadzonej w całkowitej objętości V ml, będziemy usuwać podłoże hodowlane z szybkością w, dając na to miejsce objętość świeżego podłoża równą usuniętej, to szybkość narastania stężenia drobnoustrojów w zbiorniku hodowlanym wyrazi się wzorem:

$$\frac{dB}{dT} = kB_{\dot{z}} - B\frac{w}{V}, \tag{2}$$

w którym B — całkowita ilość bakterii w zbiorniku.

A zatem, gdy Bw/V będzie większe niż $kB_{\dot{z}}$, to wyrażenie dB/dT stanie się ujemne i gęstość hodowli będzie malała wskutek zbyt szybkiego rozcieńczenia; gdy $kB_{\dot{z}}$ będzie większe niż Bw/V, to dB/dT będzie dodatnie, czyli gęstość hodowli będzie rosła, gdyż drobnoustrojów będzie usuwanych mniej, niż się ich namnaża. Hodowlę ciągłą charakteryzuje brak zmiany gęstości bakteryjnej, a więc stan przy którym $dB/dT = 0$. Wówczas zgodnie z wzorami (1) i (2):

$$kB_{\dot{z}} = B\frac{w}{V} \tag{3}$$

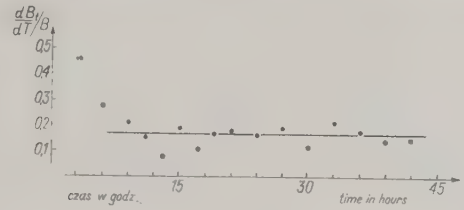
$$\frac{w}{V} = k\frac{B_{\dot{z}}}{B} = \frac{dB_t}{BdT}. \tag{4}$$

Wzór (4) określa, że przyrost liczby drobnoustrojów i odsetek drobnoustrojów żywych w całkowitej masie bakteryjnej jest funkcją szybkości usuwania zużytego podłoża, uzupełnianego świeżym. Odpowiada on wzorowi Novicka (1955) $(c) = w/V$, w którym (c) jest współczynnikiem szybkości wzrostu będącym funkcją c — stężenia substancji odżywczych.

Prawidłowo ustalony stan równowagi w hodowli ciągłej wymaga, żeby (4) było spełnione. Na rys. 8 przedstawiono doświadczalnie uzyskane w czasie hodowli wartości $dB_t\ BdT$. Wyliczona wartość wynosi 0,173 na godzinę (± 0,012 — standardowe odchylenie), podczas

gdy w tejże hodowli wymieniano na godzinę 0,175 l podłoża przy ogólnej objętości hodowli 1 l. Jest oczywiste, że stan równoważny został osiągnięty.

Szybkość rozmnażania się bakterii w czasie hodowli może być obliczona gdy znane są: całkowite stężenie bakterii i stężenie bakterii żywych. Gdy rozmna-



Rys. 8. $\frac{dB_t}{B\,dT}$ w hodowli ciągłej.

Fig. 8. The ratio of the growth rate to the bacterial count in the culture flask, during the continuous culture.

żanie następuje przez podział jednej bakterii na dwie potomne, z B_0 żywych drobnoustrojów po upływie określonego czasu powstanie B_1 drobnoustrojów zgodnie ze znaną zależnością:

$$B_1 = B_0 \times 2^n, \tag{5}$$

gdzie n jest ilością pokoleń.

Równanie (5) jest jednak słuszne tylko w tym przypadku, gdy wszystkie komórki potomne żyją i rozmnażają się w dalszym ciągu. Jeżeli jednak określony ich odsetek obumiera przed podziałem (czyli B_1 składa się z komórek żywych i martwych), to aktualna ilość pokoleń w danym przeciągu czasu jest większa. Odsetek przeżywających może być określony jak tzw. współczynnik rozmnażania p (Wilson i Miles 1948) ze stosunku miana żywego do miana całkowitego pod koniec fazy logarytmicznej:

$$p = \frac{miano\ żywe}{miano\ całkowite} + 1. \tag{6}$$

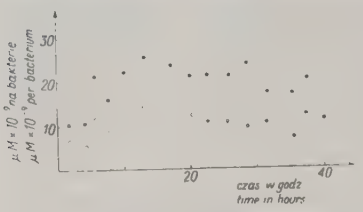
Uwzględniając zatem fakt, że z jednej komórki macierzystej powstają nie 2 komórki potomne, a p komórek potomnych, wzór (5) przybierze postać (po rozwiązaniu go względem n):

$$n = \frac{\log B_1 - \log B_0}{\log p}. \tag{7}$$

Znając zaś ilość pokoleń n powstałych w czasie t, można obliczyć przeciętny czas trwania jednej komórki macierzystej, tj. wiek jednego pokolenia G, czyli szybkość podziałów:

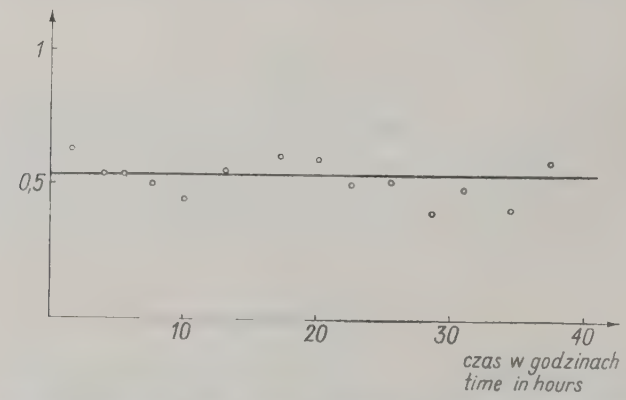
$$G = \frac{n}{t}. \tag{8}$$

Posługując się powyższymi wzorami obliczono szybkość podziałów bakteryjnych dla hodowli zilustrowanej na rys. 7. Czas trwania jednego pokolenia przed rozpoczęciem wymiany podłoża wynosił około 11 minut, podczas gdy w czasie właściwej hodowli ciągłej wynosił początkowo 35, a następnie wzrósł do 85 minut. Podane wartości wskazują, że początkowo bakterie znajdowały się w logarytmicznej fazie wzrostu, później jednak szybkość rozmnażania zmalała, śmiertelność wzrosła, a czas generacji przedłużył się do wartości zbliżonych do tych, które podali inni autorzy dla hodowli w aparaturze typu „Chemostat" (Novick, Szilard, 1950) i „Bactogen" (Gerhardt, 1946).



Rys. 9. Zużycie glikozy i ługu w hodowli ciągłej.
Fig. 9. Glucose and NaOH consumption in the continuous culture.
● NaOH ○ glucose

Metabolizm. W prowadzonej hodowli głównym źródłem energii jest glikoza. Przetwarzając ją drobnoustroje produkują kwas, neutralizowany w sposób ciągły dodawanym ługiem. Poziom glikozy w hodowli oraz kwasota środowiska są utrzymywane na stałym poziomie, wobec



Rys. 10. Molarny stosunek ilości zużytej glikozy do ilości wytworzonego kwasu
Fig. 10. Molar ratio of glucose consumed to acid produced.

czego ilość dodawanej glikozy jest miarą jej zużycia, a ilość dodawanego ługu jest miarą produkcji kwasu. Z otrzymanych wyników doświadczalnych można wyliczyć, po uwzględnieniu strat przy odciąganiu hodowli, ilość zużywanej na wytworzenie 1 drobnoustroju glikozy i ilość kwasu będącego końcowym produktem odpadowym. Wy-

niki takiego obliczenia przedstawiono na rys. 9. Widoczne jest, że przez cały czas hodowli ciągłej stosunek ilości zużytej glikozy do ilości produkowanego kwasu jest niezmienny, nie dochodzi zatem do zmiany charakteru oddychania. Obliczony stosunek ilości cząsteczek glikozy zużytej do ilości równoważników wyprodukowanego kwasu (rys. 10) wynosi $0{,}527 \pm 0{,}019$ (odchylenie standardowe). Tak więc w czasie całej hodowli, pomimo intensywnego jej napowietrzania, cykl glikolityczny bilansuje się w sposób charakterystyczny dla fermentacji kwasowej, to jest z jednej cząsteczki glikozy powstają dwie cząsteczki kwasu.

Wydajność hodowli. W tabeli II przedstawiono wydajność dwóch przykładowych hodowli ciągłych. Można przyjąć, że z 1 l hodowli uzyskuje się średnio $1{,}75 \times 10^{12}$ komórek bakteryjnych w ciągu 1 godziny, przy gęstości około 10^{10} bakterii/ml. Parametr ten jest prawdopodobnie

Tabela II

Wydajność hodowli ciągłej
Bacterial yield in the continuous culture

Godziny hodowli ciągłej Hrs of growth (beginning with steady-state)	Doświadczenie Experiment			Doświadczenie 2 Experiment 2		
	Ilość bakterii/ml w miliardach Bacterial count, 10^9 cells per 1 ml		Wydajność 10^{12} bakterii l/godz.	Ilość bakterii/ml w miliardach Bacterial count, 10^9 cells per 1 ml		Wydajność 10^{12} bakterii l/godz.
	żywych viable	całkowita total	Yield 10^{12} cells per 1 l/hr	żywych viable	całkowita total	Yield 10^{12} cells per 1 l/hr
1		9,6	1,44		9,8	1,72
2		10,6	1,48	3,8	9,8	1,72
3	4,0	11,2	1,96		10,4	1,88
4		11,3	1,98		10,4	1,88
5		11,4	1,99	3,9	10,4	1,88
6	3,2	11,2	1,96		9,8	1,71
7		12,2	2,13		9,8	1,71
8		12,2	2,13		9,4	1,64
9		12,6	2,20	2,6	9,4	1,64
10	4,2	12,4	2,16		9,0	1,57
11		12,2	2,13		10,4	1,88
12	2,8	13,0	2,27	2,5	8,6	1,50
13		12,0	2,10		9,4	1,64
14		12,0	2,10		10,8	1,89
15	1,7	11,4	1,99	2,5	10,6	1,85
16		11,6	2,03		10,2	1,78
17	2,3	11,5	2,00		9,8	1,72

słuszny również dla dowolnej objętości naczynia hodowlanego i świadczy o potencjalnych możliwościach metody hodowli ciągłej dla produkcji szczepionki. Dla przykładu można podać, że dla wyprodukowania 1000 l szczepionki przeciwdurowej (o gęstości stosowanej w Polsce) musiałby w sposób ciągły pracować 1 fermentor o pojemności 10 l przez 5 dni.

Antygenowość szczepu. Antygenowość szczepu *S. typhi* Nr. *243* w trakcie hodowli ciągłej, badana metodą aglutynacji szkiełkowej, przedstawiała się następująco:

antygen *O*: po 20 godz. hodowli + + + +, zachowując zdolność aglutynacji do momentu przerwania hodowli;

antygen *Vi*: + przez pierwszych 10-12 godzin hodowli, potem aż do momentu przerwania hodowli +++;

antygen *H*: po około 15 godz. hodowli + + + +, zachowując zdolność aglutynacji do momentu przerwania hodowli.

Tabela III

Miano aglutynacyjne w trakcie hodowli ciągłej
Agglutination titre during continuous culture

Godziny hodowli Hours of incubation	Miano Titre		
	Antygen O Antigen O	Antygen Vi Antigen Vi	Antygen H Antigen H
5	1: 640	1:20	1:320
9	1:1280	1:40	1:160
13	1:1280	1:20	1:320
17	1:2560	1:40	1:320
21	1:1280	1:40	1:320
25	1:2560	1:80	1:320
29	1:1280	1:40	1:160
33	1:1280	1:40	1:320
36	1:2560	1:20	1:320
41	1: 640	1:20	1: 80
45	1:1280	1:40	1:320

Tabela III ilustruje miana aglutynacyjne oznaczone w trakcie jednej z hodowli ciągłych. Badany szczep w warunkach normalnych jest szczepem o pełnej budowie antygenowej. Nie wydaje się, aby w warunkach hodowli ciągłej w podanym okresie czasu, antygenowość szczepu ulegała istotnym zmianom.

Wartość uodparniająca szczepionek przeciwdurowych otrzymanych z hodowli ciągłej. Po okresie 8, 15, 24 godzin hodowli ciągłej pobrano odpowiednią ilość zawiesiny bakteryjnej i przygotowano 4 rodzaje

Tabela IV

Dane kumulatywne śmiertelności myszy uodpornionych różnymi szczepionkami i nieuodpornionych w zależności od wielkości dawki zakażającej

Mice immunized with various vaccines: cumulative table of mortality as a function of challenge dose

Rodzaj szczepionki Type of vaccine	Dawka zakaż. (bakterie) Challenge dose No bacteria	Przeżyło Survivors	Padło Died	Razem Total	Dane kumulatywne Cumulative data przeżyło survivors	padło died	razem total	% śmiertelności % of mortality	probity probits
Fenolizowana wg met. 3; z bakterii z hodowli:									
Phenol-killed crude, bacteria harvested after:									
8-godzinnej 8 hours of incubation	2×10^8	2	18	20	5	18	23	78	5,78
	8×10^8	3	19	22	3	37	40	93	6,46
15-godzinnej 15 hours of incubation	2×10^8	10	10	20	11	10	21	48	4,94
	8×10^8	1	14	15	1	24	25	96	6,75
24-godzinnej 24 hours of incubation	2×10^8	10	10	20	11	10	21	48	4,94
	8×10^8	1	22	23	1	32	33	97	6,90
Fenolizowana wg met. 4; z bakterii z hodowli:									
Phenol-killed washed, bacteria harvested after:									
8-godzinnej 8 hours of incubation	2×10^8	7	15	22	9	15	24	62	5,32
	8×10^8	2	17	19	2	32	34	94	6,56
15-godzinnej 15 hours of incubation	2×10^8	9	11	20	10	11	21	52	5,06
	8×10^8	1	18	19	1	29	30	97	6,84
24-godzinnej 24 hours of incubation	2×10^8	11	9	20	13	9	22	41	4,77
	8×10^8	2	19	21	2	28	30	93	6,50
Alkoholizowana wg met. 1; z bakterii z hodowli:									
Alcoholized acc. to Felix, bacteria harvested after:									
8-godzinnej 8 hours of incubation	1×10^8	9	2	11	17	2	19	15	3,75
	2×10^8	8	3	11	8	5	13	38	4,71
	4×10^8	0	10	10	0	15	15	100	7,25
	8×10^8	0	10	10	0	25	25	100	7,44
15-godzinnej 15 hours of incubation	1×10^8	10	1	11	21	1	22	4,5	3,31
	2×10^8	4	7	11	11	8	19	42	4,80
	4×10^8	6	6	12	7	14	21	67	5,43
	8×10^8	1	14	15	1	28	29	97	6,82
24-godzinnej 24 hours of incubation	1×10^8	10	1	11	14	1	15	6,5	3,50
	2×10^8	3	8	11	4	9	13	69	5,50
	4×10^8	1	9	10	1	18	19	95	9,62
	8×10^8	0	9	9	0	27	27	100	7,29
Endo-szczepionka wg met. 2; z bakterii z hodowli:									
Endotoxic acc. to Slopek, bacteria harvested after:									
8-godzinnej 8 hours of incubation	1×10^8	11	0	11	25	0	25	0	2,75
	2×10^8	9	2	11	14	2	16	12,5	3.85
	4×10^8	4	9	13	5	11	16	69	5,49
	8×10^8	1	12	13	1	23	24	96	6,73
15-godzinnej 15 hours of incubation	1×10^8	10	1	11	22	1	23	4,3	3,29
	2×10^8	9	2	11	12	3	15	20	4,16
	4×10^8	2	11	13	3	14	17	82	5,93
	8×10^8	1	12	13	1	26	27	96	6,79
24-godzinnej 24 hours of incubation	1×10^8	9	2	11	17	2	19	10,5	3,75
	2×10^8	4	7	11	8	9	17	53	5,07
	4×10^8	3	10	13	4	19	23	83	5,94
	8×10^8	1	14	15	1	33	34	97	6,92
Myszy nieuodpornione Non-immunized, controls	2×10^8	1	2	3	4	2	6	33	4,57
	4×10^8	2	1	3	3	3	6	50	5,00
	8×10^8	0	3	3	1	6	7	86	6,07
	16×10^8	1	2	3	1	8	9	89	6,22

Tabela V

Wartości LD_{50} dla myszy uodpornionych różnymi szczepionkami przeciwdurowymi
LD_{50} values for mice immunized with various anti-typhoid vaccines

Rodzaj szczepionki Type of vaccine	LD_{50} (bakterie) No bacteria	LD_{84} (bakterie) No bacteria	LD_{16} (bakterie) No bacteria	S	N	E	f_d	$\overline{LD_{50}}$ (bakterie) No bacteria	$\underline{LD_{50}}$ (bakterie) No bacteria	$b \pm \sigma b$
Fenolizowana wg met. 3 Phenol-killed crude z bakterii z hodowli: bacteria harvested after: 8-godzinnej 8 hrs of incubation	$44{,}7\times10^6$	310×10^6	$6{,}6\times10^6$	6,85	20	0,619	3,29	147×10^6	$13{,}6\times10^6$	$1{,}19\pm1{,}05$
15-godzinnej 15 hrs of incubation	209×10^6	453×10^6	$100{,}0\times10^6$	2,12	20	0,619	1,59	332×10^6	131×10^6	$2{,}98\pm1{,}05$
24-godzinnej 24 hrs of incubation	209×10^6	417×10^6	$100{,}0\times10^6$	2,04	20	0,619	1,55	324×10^6	135×10^6	$3{,}33\pm1{,}05$
Fenolizowana wg met. 4 Phenol-killed washed z bakterii z hodowli: bacteria harvested after: 8-godzinnej 8 hrs of incubation	103×10^6	429×10^6	$45{,}7\times10^6$	3,20	22	0,590	1,99	205×10^6	$51{,}7\times10^6$	$1{,}61\pm1{,}00$
15-godzinnej 15 hrs of incubation	199×10^6	429×10^6	$92{,}5\times10^6$	2,15	20	0,619	1,61	320×10^6	124×10^6	$3{,}00\pm1{,}05$
24-godzinnej 24 hrs of incubation	240×10^6	539×10^6	101×10^6	2,31	20	0,619	1,68	403×10^6	143×10^6	$2{,}84\pm1{,}05$
Alkoholizowana wg metody 1 Alkoholized z bakterii z hodowli: bacteria harvested after: 8-godzinnej 8 hrs of incubation	203×10^6	360×10^6	102×10^6	1,88	11	0,834	1,69	343×10^6	120×10^6	$2{,}87\pm1{,}41$
15-godzinnej 15 hrs of incubation	272×10^6	485×10^6	151×10^6	1,79	23	0,570	1,40	381×10^6	194×10^6	$3{,}98\pm0{,}98$
24-godzinnej 24 hrs of incubation	203×10^6	360×10^6	102×10^6	1,88	11	0,834	1,69	343×10^6	120×10^6	$4{,}02\pm1{,}41$
Endo-szczepionka wg metody 2 Endotoxic z bakterii z hodowli: bacteria harvested after: 8-godzinnej 8 hrs of incubation	334×10^6	549×10^6	204×10^6	1,63	13	0,768	1,46	488×10^6	226×10^6	$4{,}63\pm1{,}30$
15-godzinnej 15 hrs of incubation	287×10^6	474×10^6	172×10^6	1,65	24	0,565	1,33	382×10^6	216×10^6	$4{,}59\pm0{,}96$
24-godzinnej 24 hrs of incubation	219×10^6	429×10^6	101×10^6	2,05	24	0,565	1,50	328×10^6	146×10^6	$3{,}42\pm0{,}96$
Myszy nieuodpornione Controls, non-immunized	$3{,}5\times10^6$	$10{,}2\times10^6$	$1{,}04\times10^6$	3,14	6	1,131	3,60	$12{,}5\times10^6$	$0{,}96\times10^6$	$2{,}13\pm1{,}92$

S $\frac{LD\ 84}{LD\ 50} + \frac{LD\ 50}{LD\ 16} : 2$ — funkcja nachylenia prostej — the function of the slope; N — liczba myszy użytych do doświadczenia, których śmiertelność jest zawarta między 16 - 84% (Probit 4 - 6) — number of mice in the experiment the mortality of which was between 16-84% (Probit 4-6); $E = \frac{2{,}77}{N}$; $f_d = S^E$ — współczynnik określający przedział ufności dla LD_{50} — factor determining the confidence limit for LD_{50}; $\overline{LD_{50}} = LD_{50}\times f_d$ — górna granica wartości LD_{50} — upper limit of LD_{50}; $\underline{LD_{50}} = LD_{50}: f_d$ — dolna granica wartości LD_{50} — lower limit of LD_{50}; b — współczynnik nachylenia prostej — slope;

σb $\frac{4}{\sqrt{\frac{N}{2} L \frac{K}{K-1}}}$ — błąd standardowy — standard error, gdzie — where K = ilość całkowita różnych poziomów dawki — total number of dose levels; L = różnica log dawki maksymalnej i minimalnej — the difference between the log of maximal and minimal dose

Tabela VI

Porównawcza analiza statystyczna badanych szczepionek
Comparative statistical analysis of the vaccines

Rodzaj szczepionki *A* Type of *A* vaccine	*LD50* (bakterie) No bacteria	f_1A	Rodzaj szczepionki *B* Type of *B* vaccine	*LD50* (bakterie) No bacteria	f_2B	r	f_r	Ocena
Fenolizowana wg met. 3 Phenol-killed crude z bakterii z hodowli 24-godzinnej bacteria harvested after 24 hrs of incubation	209×10^6	1,55	Fenolizowana wg met. 3 Phenol-killed crude z bakterii z hodowli 8-godzinnej bacteria harvested after 8 hrs of incubation	$44{,}7\times10^6$	3.29	4.67	3,61*	statystycznie różne significantly different
Fenolizowana wg met. 4 Phenol-killed washed z bakterii z hodowli 24-godzinnej bacteria harvested after 24 hrs of incubation	240×10^6	1,68	Fenolizowana wg met. 4 Phenol-killed washed z bakterii z hodowli 8-godzinnej bacteria harvested after 8 hrs of incubation	103×10^6	1.99	2.33	2,35	
Alkoholizowana wg met. 1 Alcoholized z bakterii z hodowli 15 godzinnej bacteria harvested after 15 hrs of incubation	272×10^6	1,40	Alkoholizowana wg met. 1 Alcoholized z bakterii z hodowli 8-godzinnej bacteria harvested after 8 hrs of incubation	203×10^6	1,69	1.34	1,85	
Endo-szczepionka wg met. 2 Endotoxic z bakterii z hodowli 8-godzinnej bacteria harvested after 8 hrs of incubation	334×10^6	1,46	Endo-szczepionka wg met. 2 Endotoxic z bakterii z hodowli 24-godzinnej bacteria harvested after 24 hrs of incubation	219×10^6	1.50	1,52	1,72	
Endo-szczepionka wg met. 2 Endotoxic z bakterii z hodowli 8-godzinnej bacteria harvested after 8 hrs of incubation	334×10^6	1,46	Fenolizowana wg met. 3 Phenol-killed crude z bakterii z hodowli 8-godzinnej bacteria harvested after 8 hrs of incubation	$44{,}7\times10^6$	3,29	7.47	3,54*	statystycznie różne significantly different
Alkoholizowana wg met. 1 Alcoholized z bakterii z hodowli 15 godzinnej bacteria harvested after 15 hrs of incubation	272×10^6	1,40	Fenolizowana wg met. 4 Phenol-killed washed z bakterii z hodowli 8-godzinnej bacteria harvested after 8 hrs of incubation	103×10^6	1.99	2,64	2,13*	statystycznie różne significantly different

f_1A, f_2B — współczynniki określające przedział ufności dla *LD50* szczepionek *A* i *B* odpowiednio — factors determining the confidence limit for *LD50* for vaccine *A* and *B* respectively;

r — LD_{50} szczepionki *A* / LD_{50} szczepionki *B* $(LD_{50}\ A \geqslant LD_{50}B)$ — $r = LD_{50}$ of vaccine *A* / LD_{50} of vaccine *B* $(LD_{50}$ of $A \geqslant LD_{50}$ of $B)$;

f_r — współczynnik określający przedział ufności dla r (oznaczony wg nomogramu 4 podanego w pracy Litchfielda i Wilcoxona 1949); gdy $r > fr$ to wartości *LD50* są statystycznie różne — factor determining the confidence limit for r (calculated acc. to Litchfield and Wilcoxon (1949) from nomogram 4); if $r > f_r$ then the *LD50* values are significantly different;

* Wartości przybliżone otrzymane przez ekstrapolację nomogramu 4.
Approximate values extrapolated from nomogram 4.

Tabela VII

Wskaźniki skuteczności różnych szczepionek przeciwdurowych
Efficiency index of various anti-typhoid vaccines

Rodzaj szczepionki Type of vaccine		Wskaźnik skuteczności: $\frac{LD_{50} \text{ myszy uodpornionych}}{LD_{50} \text{ myszy nieuodpornionych}}$ Efficiency index: $\frac{LD_{50} \text{ vaccinated mice}}{LD_{50} \text{ non-vaccinated mice}}$
Fenolizowana wg met. 3 Phenol-killed crude	z bakterii z hodowli 8-godzinnej bacteria harvested after 8 hrs of incubation	12,8
	z bakterii z hodowli 15-godzinnej bacteria harvested after 15 hrs of incubation	59,6
	z bakterii z hodowli 24-godzinnej bacteria harvested after 24 hrs of incubation	59,6
Fenolizowana wg met. 4 Phenol-killed washed	z bakterii z hodowli 8-godzinnej bacteria harvested after 8 hrs of incubation	29,4
	z bakterii z hodowli 15-godzinnej bacteria harvested after 15 hrs of incubation	56,8
	z bakterii z hodowli 24-godzinnej bacteria harvested after 24 hrs of incubation	68,4
Alkoholizowana wg met. 1 Alcoholized	z bakterii z hodowli 8-godzinnej bacteria harvested after 8 hrs of incubation	58,0
	z bakterii z hodowli 15-godzinnej bacteria harvested after 15 hrs of incubation	79,8
	z bakterii z hodowli 24-godzinnej bacteria harvested after 24 hrs of incubation	58,0
Endo-szczepionka wg met. 2 Endotoxic	z bakterii z hodowli 8-godzinnej bacteria harvested after 8 hrs of incubation	95,4
	z bakterii z hodowli 15-godzinnej bacteria harvested after 15 hrs of incubation	82,0
	z bakterii z hodowli 24-godzinnej bacteria harvested after 24 hrs of incubation	62,8

szczepionek z każdej z zawiesin, pobranych w różnych czasach trwania hodowli. Z otrzymanymi w ten sposób szczepionkami przeprowadzono test czynnego uodpornienia myszy. Wyniki podają tabele IV i V oraz rys. 11. Przedstawione wyniki mogą posłużyć do porównawczej oceny zdolności uodparniających różnych szczepionek, jeżeli w czasie eksperymentu nie uległa zmianie zjadliwość drobnoustrojów podanych jako dawka zakażająca. Wskazówką na brak takiej zmiany jest wg Litchfielda i Fertiga (1941) równoległość prostych przedstawionych na rys. 11, obrazujących zależność pomiędzy śmiertelnością (probitami) a dawką zakażającą. Przeprowadzona dla prostych z rys. 11

Rys. 11. Test czynnego uodpornienia myszek szczepionkami:
Fig. 11. Mouse active protection test, employing the following vaccines:

I — Fenolowa pełna (met. 3) — Whole culture phenol-killed vaccine, II — Fenolowa wg met. 4 — Washed bacteria phenol-killed vaccine, III — Alkoholizowana (met. 1) — Alcoholized vaccine acc. to Felix, IV — Endo-szczepionka (met. 2) — Endotoxic vaccine acc. to Słopek, V — Myszy nieszczepione — Non immunized controls, △ — po 8 godzinach hodowli — bacteria harvested after 8 hours of incubation, ● — po 15 godzinach hodowli — bacteria harvested after 15 hours of incubation, □ — po 24 godzinach hodowli — bacteria harvested after 24 hours of incubation

analiza statystyczna wykazuje, że prawdopodobieństwo występowania różnic w nachyleniu pomiędzy prostymi wynosi: dla szczepionek fenolizowanych wg metody 3 $P > 0{,}1$, dla szczepionek fenolizowanych wg metody 4 $P > 0{,}3$, dla szczepionek alkoholizowanych wg metody 1 $P > 0{,}5$, dla endo-szczepionek (wg metody 2) $P > 0{,}5$, dla poszcze-

gólnych szczepionek między grupami (z wyjątkiem szczepionek 8-godzinnych fenolizowanych) $P > 0,3$, dla 8-godzinnych szczepionek fenolizowanych w porównaniu z pozostałymi szczepionkami $P = 0,01$-$0,35$, pomiędzy myszami nieszczepionymi a uodpornionymi $P > 0,3$. Jak widać, proste można uznać za równoległe, a jedynie 8-godzinne szczepionki fenolizowane wykazują w niektórych wypadkach różnice statystycznie znaczące.

Wyniki powyższej analizy upoważniają zatem do porównania zdolności uodparniającej badanych szczepionek, z wyjątkiem szczepionek 8-godzinnych fenolizowanych. W tabeli VI porównano dawkę skrajnie różniących się wartości LD_{50} przy stosowaniu różnych szczepionek. Szczepionki alkoholizowane i endo-szczepionka oraz szczepionki fenolizowane po 15 i 24 godzinach hodowli nie różnią się między sobą, a tylko szczepionki 8-godzinne fenolizowane wydają się mniej wartościowe. Ponieważ jednak eksperyment, w którym mierzono wartość tych ostatnich szczepionek, wykazał odmienną zależność pomiędzy procentem śmiertelności a dawką zakażającą oraz wysokie współczynniki błędu, wynik ten nie może być traktowany jako udowodniony.

Wartość uodparniającą różnych szczepionek przejrzyście ilustruje tak zwany wskaźnik skuteczności (Bonet-Maury, Jude, Servant, 1954):

$$\frac{LD_{50} \text{ myszy szczepionych}}{LD_{50} \text{ myszy nieszczepionych}}$$

Dla badanych szczepionek wskaźniki te przedstawia tabela VII. Otrzymane wyniki wskazują, że badany szczep nie ulega zmianom antygenowym, które wpływałyby na wskaźniki skuteczności szczepionek z różnych okresów trwania hodowli — przynajmniej w badanym okresie około 40 godzin. Rozpatrując brak różnic pomiędzy poszczególnymi rodzajami szczepionek należy pamiętać, że przedstawione wyniki posiadają stosunkowo wysokie współczynniki błędu, spowodowane niekorzystnym doborem dawek zakażających, a przez to zbyt małą ilością zwierząt użytych w najkorzystniejszym obszarze doświadczalnym. Wskaźniki skuteczności szczepionek durowych wg danych literatury różnią się znacznie w publikacjach różnych autorów. Tak np. wartości te wahają się od 1,94 do 14,70 (Bonet-Maury i inni, 1954) i od 242 do 740 (Płachcińska, 1956); utrudnia to przeprowadzenie jakichś dalszych porównań.

Zagadnienie oceny skuteczności szczepionek tyfusowych jest niezwykle trudnym i skomplikowanym problemem. Doświadczenia wykonane na zwierzętach nie obrazują w sposób dokładny i jednoznaczny zjawisk odpornościowych zachodzących u ludzi w wyniku szczepienia

i obarczone są szeregiem błędów metodycznych (Felix, Anderson, 1951). O wartości szczepionek można wnosić na podstawie połączonych wyników analizy antygenowej, testu czynnego uodpornienia i testu biernego uodpornienia. Ostatecznym jednak kryterium wartości szczepionki może być tylko analiza statystyczno-epidemiologiczna, w przypadku szczepionek durowych przeprowadzona na ludziach.

LITERATURA

Bonet-Maury, P., Jude, A., Servant, P., 1954: La mesure statistique de la virulence et de l'immunité. *Rev. Immunol.*, **18:** 21.

Felix, A., 1941: A new type of typhoid and paratyphoid vaccine. *Brit. Med. J.*, **1:** 391.

Felix, A., Anderson, E. S., 1951: Bacteriophage, virulence and agglutination test with a strain of *Salmonella typhi* of low virulence. *J. Hyg. (Camb.)*, **49:** 349.

Formal, S. B., Baron, L. S., Spilman, W., 1956: The virulence and immunogenicity of *Salmonella typhosa* grown in continuous culture. *J. Bact.*, **72:** 168.

Fujita, A., Iwatake, D., 1931: Bestimmung des echten Blutzukers ohne Hefe. *Biochem Ztschft.*, **242:** 43.

Gerhardt, P., 1946: Continuous culture studies. *J. Bact.*, **52:** 283.

Horodko, J., Krassowska, L., Naimski, K., Zakrzewski, K., 1958: Continuous culture of *Salmonella typhi* as a method for production of vaccine. *VII-th Int. Congress Microbiol. Abstracts.*: 21b; 365.

Litchfield, J. T. jr., Fertig, J. W., 1941: On a graphic solution of the dosage-effect curve. *Bull. John Hopkins Hosp.*, **69:** 276.

Litchfield, J. T. jr., Wilcoxon, F., 1949: A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J. Pharm. Exp. Therap.*, **96:** 99.

Miles, A. A., Misra, S. S., 1938: The estimation of the bactericidal power of the blood. *J. Hyg. (Camb.)*, **38:** 732.

Monod, J., 1950: La technique de culture continue. *Ann. Inst. Pasteur*, **79:** 390.

Novick, A., 1955: Growth of bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.*, **9:** 97.

Novick, A., Szilard, L., 1950: Experiments with the chemostat on spontaneous mutations of bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **36:** 708.

Płachcińska, J., 1956: Próba zastąpienia mucyny zwierzęcej wyciągiem z nasion lnu w doświadczalnym zakażeniu myszy pałeczkami *S. typhi*. *Przegl. Epidemiol.*, **10:** 319.

Reed, L. J. Muench, H., 1938: A simple method of estimation fifty per cent endpoints. *Amer. J. Hyg.*, **27:** 493.

Ślopek, S., 1947: Precypitowana szczepionka durowo-paradurowa *TAB* prec. *Med. Dośw. Społ.*, **25:** 171.

Turowski, G., Kusiak, B., 1958: Zastosowanie hodowli napowietrzanej głębinowej pałeczek *Salmonella typhi*, *S. paratyphi A* i *B* do produkcji szczepionki. *Farm. Polska*, **23:** 395.

Weiss, E. S., 1948: An abriged table of probits for use in the graphic solution of the dosage-effect curve. *Amer. J. Publ. Health*, **38:** 22.

Wilson, G. S., Miles, A. A., 1948: Topley and Wilson's principles of bacteriology and immunity. 3rd ed., London.

Janina Horodko, Ligia Krassowska, Krzysztof Naimski,
and *Kazimierz Zakrzewski*

CONTINUOUS CULTURE OF *SALMONELLA TYPHI* AS A METHOD FOR PRODUCTION OF VACCINE

Summary

The paper describes an attempt at application of the continuous culture for the production of typhoid vaccine.

Salmonella typhi No. *243* was grown in a culture medium composed of tryptic digest of casein (6-8 g N/l), calcium chloride-0.002 g/l, magnesium chloride 0.0117 g/l, potassium chloride 0.2 g/l, potassium dihydrogen phosphate 0.25 g/l, sodium carbonate 0.4 g/l, glucose 10 g/l. The apparatus employed, shown in Fig. 1 and 2 and in photography page 354, makes it possible to withdraw bacterial suspension, to add fresh ingredients, and to measure *pH*, all in a continuous manner. It also has the facilities for efficient and controlled stirring and aeration. Bacteria were grown at 37°C at *pH* 7; *pH* was measured by antimony-calomel electrode system attached to a registering *pH*-meter. Total bacterial count was determined nephelometrically, the viable count by agar plating technique.

The optimal nitrogen concentration in the medium was found to be 6 g/l in the initial period of growth, and 8 g/l in the later stages (Fig. 3). The limiting concentration of glucose was 3 g/l (Fig. 5). Neither the rate of growth nor the total number of cells produced were influenced by a threefold increase in the concentration of inorganic salts; also varying the aeration rate between 30 and 200 l/hr/l did not affect the growth. The maximum concentration of bacterial cells attainable was 1.8×10^{10} per ml.

Continuous withdrawal of the medium was started after the cell population reached 10^{10} cells/ml. It has been found thad at the flow rate of 0.175 l/hr per 1 l of the culture the steady state was established with the total bacterial count maintained at $1.0\text{-}1.2\times10^{10}$ cells/ml, viable count $0.15\text{-}0.4\times10^{10}$ cells/ml (Fig. 7). In the steady state glucose consumption was 5-6 g/hr and the alkali consumption about 35 mEq/hr, both calculated per 1 l of the culture. For the production of 1 bacterial cell about 10×10^{-9} μM of glucose is consumed. The constancy of glucose: acid ratio (see Fig. 10) indicates that the glycolytic pattern of metabolism is maintained throughout the steady state period of cultivation.

The average yield of bacterial cells was 2×10^{12} per hour per 1 l of the culture medium.

The purpose of the experiments being the production of typhoid vaccine, the antigenic properties of bacteria were assayed. The *O*, *H* and *Vi* antigens appeared within the first few hours of incubation, and were maintained throughout the period of cultivation. For the study of immunizing properties of the bacteria at various stages of growth four different vaccines have been prepared: alcoholized vaccine acc. to Felix, endotoxic vaccine acc. to Grasset as modified by Ślopek, the whole-culture phenol-killed vaccine, and washed bacteria phenol-killed vaccine. The strength of each of the vaccines corresponded to 2×10^{9} cells/ml. Separate batches of vaccines were prepared from bacteria harvested after 8, 15 and 24 hours incubation.

The assay of immunizing properties of the vaccines so prepared was carried out by injecting mice subcutaneously with 0.25 ml i. e. 0.5×10^{9} cells.

twice at a two week interval. The mice have been challanged with a variable dose of live bacteria mixed with a mucin-like enhancing agent. 14 days after the last injection of vaccine. The mortality rate has been calculated acc. to Bonet-Maury, Jude, Servant (1954) and acc. to Litchfield, Fertig (1941). The appropriate calculations are shown in Tables IV, V, VI, and VII. As indicated by the parallel course of the regression lines (cf. Fig. 11) the results for all the vaccines may be compared with a possible exception of the phenol-killed vaccines which were prepared with 8 hrs old bacteria. The efficiency index acc. to Bonet-Maury and al. has been calculated and is shown in table VII: it is evident that, but for the vaccines prepared from the youngest cultures, all others are of comparable value.

Adresy autorów:
Authors' address:

Mgr Janina Horodko,
Warszawa, ul. Czarnieckiego 8 m. 4;
Mgr Ligia Krassowska,
Warszawa, ul. Terespolska 9 m. 2;
Doc. dr Kazimierz Zakrzewski,
Warszawa, ul. Nowy Świat 41a

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1961, 10 : 371 - 378

Marian Hierowski

WPŁYW RYBONUKLEAZY NA AKTYWACJĘ AMINOKWASÓW U *ESCHERICHIA COLI K 12a*

Z Zakładu Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej w Poznaniu

Otrzymano dnia 5 lutego 1961 r.

Streszczenie

Badano wpływ krystalicznej rybonukleazy na aktywację l-aminokwasów u *E. coli K 12a*. Dodatek krystalicznej rybonukleazy do mieszaniny inkubacyjnej nie obniżał aktywacji l-aminokwasów. Natomiast uprzednia inkubacja enzymów aktywujących z rybonukleazą powodowała prawie trzykrotne zmniejszenie zawartości kwasów hydroksamowych badanych l-aminokwasów.

Nohara i Ogata (1959) działając krystaliczną rybonukleazą na *enzymy pH* 5 z wątroby królika, a następnie używając je do badań nad aktywacją aminokwasów, stwierdzili obniżający wpływ rybonukleazy na ten proces. Te doświadczenia oraz badania Hoaglanda i współpracowników (1957) zapoczątkowały badania nad drugim stopniem biosyntezy białka. Stopień ten obejmuje zespół reakcji prowadzących do połączenia aktywnego aminokwasu z rozpuszczalnym kwasem rybonukleinowym. Drugi stopień biosyntezy białka można przedstawić (Hoagland i współpr., 1957; Ogata i Nohara, 1957; Ogata, Nohara i Okita, 1957) za pomocą reakcji:

$$A—AMP—E+sRNA \rightleftharpoons A—sRNA+AMP+E,$$

gdzie: *A* — aminokwas, *AMP* — kwas adenozynojednofosforowy, *E* — enzymy aktywujące, *sRNA* — niskocząsteczkowy rozpuszczalny kwas rybonukleinowy.

Połączenie aminokwas · *sRNA* jest wiązaniem estrowym pomiędzy grupą karboksylową aminokwasu i *2'* lub *3'* grupą hydroksylową rybozy końcowej adenozyny, dającym reakcję z hydroksylaminą (Berg, Ofengand, 1958; Hecht i współpr., 1958; Zachau i współpr. 1958).

BADANIA WŁASNE

Szczep *K 12a E. coli* hodowano na pożywce mineralnej wg Pardeego. Dokładny opis preparatyki enzymów aktywujących podano w uprzedniej pracy (Hierowski i Stolzmann, 1961). Roztwór enzymów aktywujących otrzymanych zgodnie z tym opisem nazwano *pH* 5 E_1 enzymami. Celem otrzymania enzymów *pH* 5 E_2 pobrano 1 ml roztworu enzymów *pH* 5 E_1 i dodano do niego 1 ml (100 μg) roztworu krystalicznej rybonukleazy rozpuszczonej w 0,2 M Tris-buforze o *pH* 7,8, a następnie inkubowano w 37° przez pół godziny. Po inkubacji *pH* roztworu sprowadzano 0,2 N HCl do *pH* 5 i wirowano w 0° przez 10 minut przy 10 000xg. Następnie rozpuszczano osad w 1 ml 0,2 M Tris-buforu o *pH* 7,8 i wirowano ponownie w 0° przez kilka minut przy 10 000 xg. Górną warstwę roztworu używano do dalszych badań pod nazwą *pH* 5 E_2 enzymów. Celem otrzymania roztworu enzymów *pH* 5 EK_2 do prób kontrolnych, przeprowadzono całą procedurę jak powyżej, z tym, że zamiast 1 ml roztworu krystalicznej rybonukleazy w 0,2 M Tris-buforze dodano 1 ml samego roztworu buforu.

Oznaczanie. Badano następujące mieszaniny inkubacyjne:

I. Mieszanina inkubacyjna badana zawierała w 1 ml: $MgCl_2$ 10 μmoli, 0,2 ml 0,2 M Tris-buforu o *pH* 7,8, l-aminokwasów 10 μmoli, Na_2ATP 11 μmoli, NH_2OH 1500 μmoli, pirofosfatazy 5 μg, 0,1 ml preparatu enzymów *pH* 5 E_1 i 10 μg krystalicznej rybonukleazy.

Mieszanina inkubacyjna normalna zawierała w 1 ml: $MgCl_2$ 10 μmoli, 0,2 ml 0,2 M Tris-buforu o *pH* 7,8 l-aminokwasów 10 μmoli, Na_2ATP 11 μmoli, NH_2OH 1500 μmoli, pirofosfatazy 5 μg, 0,1 ml preparatu enzymu *pH* 5 E_1.

Mieszaniny inkubacyjne kontrolne zawierały w 1 ml: $MgCl_2$ 10 μmoli 0,2 ml 0,2 M Tris-buforu o *pH* 7,8, Na_2ATP 11 μmoli, NH_2OH 1500 μmoli, pirofosfatazy 5 μg, 0,1 ml preparatu enzymu *pH* 5 E_1 oraz 10 μg krystalicznej rybonukleazy w zależności od części doświadczenia.

II. Mieszanina inkubacyjna badana zawierała w 1 ml: $MgCl_2$ 10 μmoli, 0,2 ml 0,2 M Tris-buforu o *pH* 7,8, l-aminokwasów 10 μmoli, Na_2ATP 11 μmoli, NH_2OH 1500 μmoli, pirofosfatazy 5 μg, 0,1 ml preparatu enzymu *pH* 5 E_1.

Mieszanina inkubacyjna normalna zawierała w 1 ml: $MgCl_2$ 10 μmoli, 0,2 ml 0,2 M Tris-buforu o *pH* 7,8, l-aminokwasów 10 μmoli, Na_2ATP 11 μmoli, NH_2OH 1500 μmoli , pirofosfatazy 5 μg, 0.1 ml preparatu enzymów *pH* 5 EK_2

Mieszaniny inkubacyjne kontrolne zawierały w 1 ml: $MgCl_2$ 10 μmoli, 0.2 ml 0,2 M Tris-buforu o *pH* 7,8, Na_2ATP 11 μmoli, NH_2OH 1500 μmoli, pirofosfatazy 5 μg, 0,1 ml roztworu enzymów *pH* 5 EK_2 lub *pH* 5 E_2 w zależności od części doświadczenia.

Krystaliczną rybonukleazę (Worthington Biochem. Corp.) w ilości 10 μg rozpuszczono w 0,2 M Tris-buforze o *pH* 7,8. Badaną mieszaninę dziesięciu aminokwasów w ilości 1 μmola każdy stanowiły: l-α-alanina (Roche), l-argininy HCl (Nutritional Biochemicals Corp.), l-cysteiny HCl (Schuhardt) glicyna (Gliwice), l-histydyna (Nutritional Biochemicals Corp.), kwas dl-asparaginowy (Gliwice), kwasu l-glutaminowego HCl (Light), l-leucyna (Schuhardt), l-tryptofan (Roche), l-tyrozyna (Roche).

Pozostałe odczynniki, inkubację mieszanin oraz metodę oznaczania kwasów hydroksamowych badanych l-aminokwasów podano w poprzedniej pracy (Hierowski, Stolzmann, 1961).

WYNIKI

Otrzymane wyniki zawarte są w tabeli I. W poszczególnych doświadczeniach preparowano enzymy aktywujące z tego samego proszku acetonowego.

Dodanie krystalicznej rybonukleazy bezpośrednio do mieszaniny inkubacyjnej nie powoduje obniżenia aktywacji aminokwasów (część 1 tabeli). Zawartość kwasów hydroksamowych l-aminokwasów w mieszaninach inkubacyjnych bez rybonukleazy jest nieznacznie wyższa od zawartości kwasów hydroksamowych l-aminokwasów w mieszaninach inkubacyjnych z rybonukleazą. Te nieznaczne różnice w zawartości kwasów hydroksamowych l-aminokwasów w mieszaninach inkubacyjnych z rybonukleazą i bez dodania rybonukleazy widać wyraźnie z porównania obu kolumn różnic części 1 tabeli. Natomiast dodanie enzymów *pH* 5, inkubowanych uprzednio z rybonukleazą, do mieszanin inkubacyjnych powoduje znaczne obniżenie zawartości kwasów hydroksamowych l-aminokwasów (część 2 tabeli).

Z porównania obu kolumn różnic widać wyraźnie efekt działania rybonukleazy, uwidaczniający się w prawie trzykrotnym zmniejszeniu zawartości kwasów hydrosamowych l-aminokwasów (część 2 tabeli).

DYSKUSJA

Stwierdzone obniżenie przez rybonukleazę stopnia aktywacji aminokwasów u *E. coli K 12a* jest zgodne z wynikami otrzymanymi przez Noharę i Ogatę (1959) w doświadczeniach prowadzonych na wątrobie królika. Badania Allena i współpracowników (1960a, b) nad enzymami aktywującymi wykazały istnienie we frakcjach *pH* 5 enzymów frakcji kwasu rybonukleinowego, tzw. *pH* 5*RNA*. Dalsze badania tych uczonych nad rozpuszczalnym *RNA* dowiodły, że nie cały *pH* 5 *RNA* bierze udział w przenoszeniu aktywowanych aminokwasów do mikrosomów. Udało im się otrzymać frakcję kwasu rybonukleinowego czynną w tym procesie. Nazwali go *transfer RNA*. *Transfer RNA* nie traci aktywności przy przechowywaniu i jest dość odporny na podwyższoną temperaturę. Jego ciężar cząsteczkowy, oznaczony przy pomocy ultrawirówki, waha się w granicach 30 000 do 50 000. Według Schweeta i współpr. (1958) oraz Allena i współpr. (1960a, b) *transfer RNA* posiada łańcuchy polinukleotydowe (70-90 nukleotydów) specyficzne dla poszczególnych aminokwasów, zawsze z końcową grupą *AMP*. Według Hechta i współpr. (1958) oraz Zachaua i współpr. (1958) *AMP* jest konieczny dla reakcji aktywnego aminokwasu z *transfer RNA*. Wreszcie Allenowi i współpr. (1960a, b) udało się odkryć istnienie specjalnych enzymów katalizujących reakcję

Tabela

Wpływ rybonukleazy na aktywację aminokwasów enzymami pH 5 E_1
The effect of RN-ase on the activation of amino acids with pH 5 E_1 enzymes

Eksperyment Nr Experiment No	µmole kwasów hydroksamowych na naczyńko µmoles hydroxamic acids per flask					
	bez rybonunkleazy without RN-ase			z rybonukleazą with RN-ase		
	bez aminokwasów without amino acid mixture	z aminokwasami with amino acid mixture	różnica difference	bez aminokwasów without amino acid mixture	z aminokwasami with amino acid mixture	różnica difference
1	0,035	0,290	0,255	0,112	0,321	0,209
2	0,072	0,270	0,198	0,180	0,345	0,165
3	0,028	0,237	0,209	0,090	0,296	0,206
średnia mean value	0,045	0,266	0,221	0,127	0,321	0,193

c. d. tabeli ze str. 374

Eksperyment Nr Experiment No	µmole kwasów hydroksamowych na naczyńko µmoles hydroxamic acids per flask					
	pH 5 E_1 bez rybonukleazy *RN*-ase-untreated *pH* 5 E_1			*pH* 5 E_1 po działaniu rybonukleazą *RN*-ase-treated *pH* 5 E_1		
	bez aminokwasów without amino acid mixture	z aminokwasami with amino acid mixture	różnica difference	bez aminokwasów without amino acid mixture	z aminokwasami with amino acid mixture	różnica difference
1	0,040	0,210	0,170	0,087	0,150	0,063
2	0,080	0,207	0,127	0,105	0,167	0,062
3	0,014	0,172	0,158	0,052	0,098	0,046
Średnia Mean value	0,045	0,196	0,152	0,081	0,138	0,057

przyłączenia do końcowych grup *transfer RNA* innych grup nukleotydowych. Zamecnik i Stephenson (1960) wykazali istnienie specyficznego *sRNA* dla waliny. Zastosowanie przez Holleya i współpr. (1960) wielokrotnej chromatografii kolumnowej doprowadziło do odkrycia specyficznych *sRNA* dla poszczególnych aminokwasów. Canellakis i Herbert (1960) frakcjonując *sRNA* wątroby szczura otrzymali trzy jego frakcje (α, β, γ), przy czym żadna z nich, pozbawiona czynnika białkowego, nie była zdolna do enzymatycznej dobudowy nukleotydów do *sRNA*, zgodnie z reakcją:

$$XTP + sRNA \rightleftharpoons XMP + PP,$$

gdzie: *X* oznacza nukleozyd purynowy lub pirimidynowy.

Ostatnie badania Von der Decken i Hultina (1960) wskazują na odrębność enzymów aktywujących aminokwasy i enzymów przenoszących nukleotydy na *sRNA*. Badacze ci uważają, że enzymy przenoszące nukleotydy do *sRNA* są odrębne dla poszczególnych aminokwasów. Reakcje zastąpienia końcowych grup *sRNA* przez wolne nukleotydy odgrywają zapewne rolę w późniejszych stadiach biosyntezy białka, związanych z kształtowaniem się drugo- i trzeciorzędnej struktury białka.

Otrzymane wyniki, przedstawione w tabeli, potwierdzają tę drogę biosyntezy białka także u *E. coli K 12a*. Na podstawie tych wyników można wnioskować, że rozpuszczalny kwas rybonukleinowy jest akceptorem aktywnych aminokwasów u *E. coli K 12a* oraz że *pH 5 enzymy* zawierają w swej frakcji kwas rybonukleinowy biorący udział w przenoszeniu aktywnych aminokwasów do rybosomów.

LITERATURA

Allen, E. H., Glassman, E., Schweet, R. S., 1960a: Incorporation of amino acids into ribonucleic acid I. Role of activating enzymes. *J. Biol. Chem.*, **235**: 1061.

Allen, E. H., Glassman, E., Schweet, R. S., 1960b: II. Amino acid transfer ribonucleic acid. *J. Biol. Chem.*, **235**: 1068.

Berg, P., Ofengand, E. J., 1958: An enzymatic mechanism for linking amino acids to *RNA*., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **44**: 78.

Canellakis, E. S., Herbert, E., 1960: Studies on *s-RNA* synthesis II. Assay and method of purification of *s-RNA* α, β and γ. *Biochim. Biophys. Acta.*, **45**: 133.

Decken von der, A., Hultin, T., 1960: Activity of rat-liver enzymes in the transfer of *s-RNA*-bound amino acids to protein by ribonucleoprotein particles., *Biochim. Biophys. Acta.*, **45**: 139.

Hecht, L. J., Stephenson, M. L., Zamecnik, P. C., 1958: Dependence of amino acid binding to soluble ribonucleic acid on cytidine triphosphate. *Biochim. Biophys. Acta.*, **29**: 460.

Hierowski, M., Stolzmann, Z., 1961: Wpływ chloramfenikolu na aktywację aminokwasów u *Escherichia coli K 12a*. *Acta Microbiol. Polon.*, **10**: 135.
Hoagland, M. B., Zamecnik, P. C., Stephenson, M. L., 1957: Intermediate reactions in protein biosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta.*, **24**: 215.
Holley, R. W., Apgar, J., Doctor, B. P., 1960: Separation of amino acid-specific "soluble" fraction ribonucleic acids. *Ann. New York Acad. Sci.*, **88**: 745.
Nohara, H., Ogata, K., 1959: Studies on the *pH* 5 enzyme I. The effects of ribonuclease and some *SH* inhibitors on the amino hydroxamate formation by the *pH* 5 enzyme of rabbit liver., *Biochim. Biophys. Acta.*, **31**: 142.
Ogata, K., Nohara, H., 1957: The possible role of the ribonucleic acid (*RNA*) of the *pH* 5 enzyme in amino acid activation. *Biochim. Biophys. Acta*, **25**: 659.
Ogata, K., Nohara, H., Morita, T., 1957: The effect of ribonuclease on the amino acid-depent exchange between labeled inorganic pyrophosphate ($^{32}P^{32}P$) and adenosine triphosphate (*ATP*) by the *pH* 5 enzyme. *Biochim. Biophys. Acta.* **26**: 657.
Schweet, R. S., Bovard, F. C., Allen, E. H., Glassman, E., 1958: The incorporation of amino acids into ribonucleic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **44**: 173.
Zamecnik, P. C., Stephenson, M. L., 1960: Partial purification of transfer *RNA., Ann. New York Acad. Sci.*, **88**: 708.
Zachau, H. G., Acs, G., Lipman, F., 1958: Isolation of adenosine amino acid esters from a ribonuclease digest of soluble, liver ribonucleic acid.. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **44**: 885.

Marian Hierowski

INFLUENCE OF RIBONUCLEASE ON AMINO ACID ACTIVATION IN *ESCHERICHIA COLI K 12a*

Summary

The influence of crystalline *RN*-ase on amino acid activation in *E. coli K 12a* was investigated. From *E. coli K 12a* acetone powder was obtained and from this powder *pH* 5 enzymes were prepared. Amino acid activation was measured by the hydroxamic method. The addition of crystalline *RN*-ase to the incubation mixture did not influence the amino acid activation. The previous incubation of activating enzymes with *RN*-ase caused threefold decrease in the content of the hydroxamic acid.

Adres autora:
Author's address:

Marian Hierowski,
Zakład Chemii Fizjologicznej
Akademii Medycznej w Poznaniu,
Poznań, ul. Święcickiego 6

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1961, 10 : 379 - 388

Wincenty Drożański and *Danuta Drożańska*

DEAD BACTERIA AS FOOD FOR AMOEBAE

From the Department of General Microbiology,
Mariae Curie-Skłodowska University, Lublin

Received January 2, 1960

Summary

Gramnegative microorganisms killed at 100°C are unsuitable as food for soil amoebae. On the other hand grampositive bacteria killed in this way and all examined microorganisms killed by other methods (penicillin, repeated freezing and thawing ect) were readily eaten by amoebae. Extracts from disrupted *Aerobacter* or yeast cells stimulated the ingestion of gramnegative microorganisms killed at 100°C and made them suitable as food for amoebae.

In natural conditions the free-living amoebae as holozoic organisms depend for their nutritional needs on microorganisms.

In laboratory conditions the culture of amoebae is prepared on solid media jointly with a given species of bacteria, this being their only source of nutrition (Tsuijtani, 1898; Mouton, 1902; Oehler, 1916; Castellani, 1930; Singh, 1950; Prescott and James, 1955; Ray, 1951, 1954; Bakerspigel, 1956; Kunicki-Goldfinger, Drożański *et al.*, 1957; Harrison, 1957; Neff, 1957, 1958).

The researches of Singh (1941, 1942, 1945), Imszeniecki (1947), Dudziak (1955), Drożański (1956), Kunicki-Goldfinger *et al.* (1957) have shown that not all bacteria are an equally suitable food for soil amoebae.

Physiological and biochemical investigations are made difficult by the presence of living bacteria in the cultures of amoebae. Oehler (1916), Castellani (1930), and Lwoff (1932) obtained a culture of amoebae on cells of bacteria killed by desiccation or by applying a temperature of 55-60°C. According to Oehler (1916) the cells of *Escherichia coli* killed by heating at 130°C for an hour are not ingested by amoebae, while a suspension of living cells of these bacteria or of their cells killed by the temperature of 56°C acting for 1,5 hour is a suitable food for them.

Brent (1954) informs that *Tetramitus rostratus* develops well on a medium composed of an extract of Bacto-yeast and Bacto-pep-

tone in the presence of *Bacillus cereus*, killed by a high temperature. If we substitute *E. coli* for *Bac. cereus* we must add liver extract to enable *Tetramitus* to grow. Lamy and Molinary (1958) applying antibiotics have shown that *Entamoeba histolytica* does not grow on a medium deprived of living bacteria.

Our purpose is to investigate the utility of cells of different bacteria and yeast killed by different methods as food for soil amoebae and to test the influence of an addition of extracts from desintegrated cells of *Aerobacter aerogenes* and *Saccharomyces cerevisiae* on amoebae nourished on bacteria killed by heating at 100°C.

MATERIALS AND METHODS

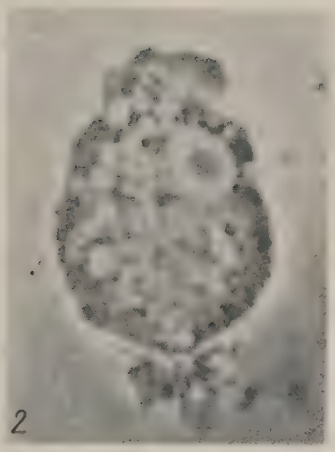
Amoebae. We have examined two types of small soil amoebae of the *Hartmanelidae* family, designated as amoebae *B* and *D*.

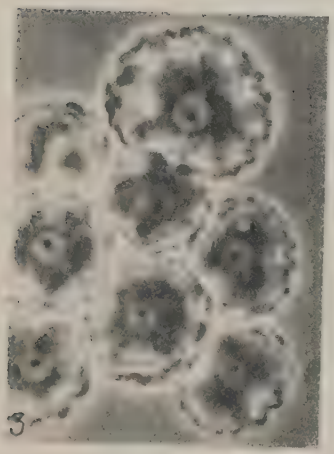
The average diameter of an amoeba is about 18-20 μ. The trophic forms of both the types of amoebae in identical culture conditions do not show any differences (Phot. 1 and 2). The characteristic feature of the amoebae is their very slow movement, (about 1 mm per hour). They thrust out a single lobopodium in the direction of their movement and at the same time many filopodia on surface of the whole body. At mechanical irritation they take the form of a ball and this deprives them for a certain time of the mobility. In a liquid medium and in the presence of motile bacteria they form a clump of agglutinated bacteria (Phot. 2).

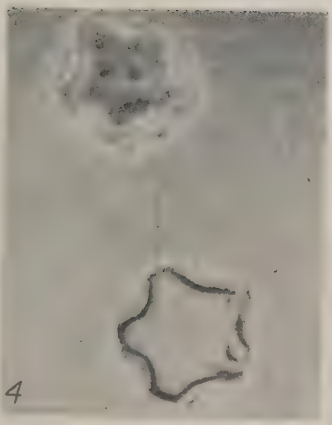
We can distinguish in their protoplasm a narrow ectoplasm and the endoplasm. The ectoplasm is nearly always placed in the pseudopodium, in its interior we observe many dark granulations of an average diameter of about 0.5-2 μ. They are particularly visible in a contrast-phase microscope. One or two pulsating and many digesting vacuoles are also visible, their size depends on the kind of food absorbed and its quanitity. There are no cristals and no irregular inclusions.

The nucleus is round or slightly concave, its average diameter is about 6-8 μ, it is bright and contains dark nucleolus (phot. 1 and 2). In young cultures the cells have one nucleus. In older ones especially in the presence of much food we can observe amoebae with two or more nuclei.

After 6-8 days of culture on a solid medium at the temperature of 22° the amoebae change into cyst. The encystement begins with their assembling in agglomerations; they take a round form and cease to ingest food. At the same time the border between the ectoplasm and endoplasm disappears and there appears a fine protecting membrane. The encystment lasts 12-18 hours. The forms of the spores of both the described types of amoebae are different. The amoebae of type *B* form round cysts with a double membrane. Their exterior membrane is slightly creased and the interior forms distinct concavities (Phot. 3). The amoebae type *D* also form a cyst with a double membrane and the interior membrane has the characteristic feature of a five-pointed star (Phot. 4). In both types of amoebae there arizes an operculum in the place of contact between the exterior and the interior membrane. The average diameter of the cysts is about 16-24 μ. They have one nucleus but sometimes we can observe in the culture of the amoeba type *B* cysts with two or more nuclei. The nuclei of the

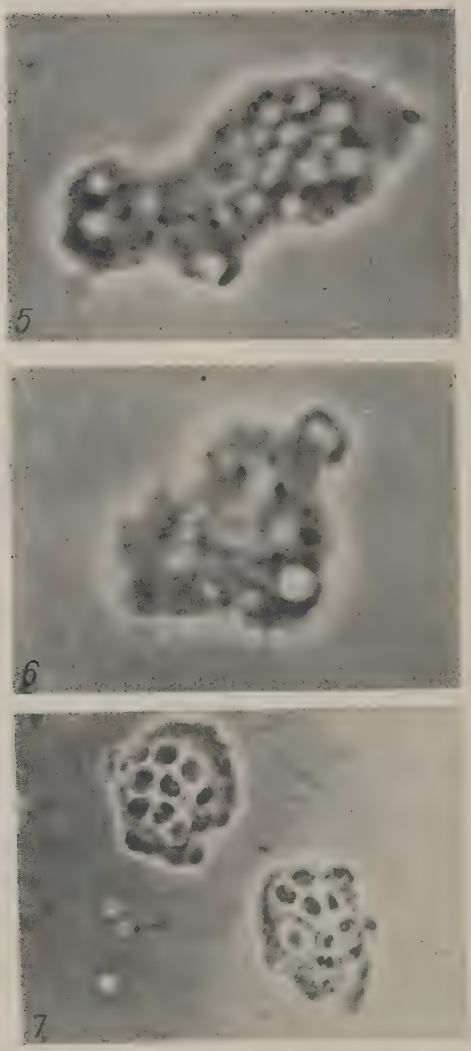






Phot. 1. Trophic forms of strain *B* of amoebae
Phot. 2. Vegetative ameba (strain *D*) with a posteriorly located clump of agglutinated bacteria
Phot. 3. Cysts of amoebae of the strain *B*
Phot. 4. Cysts of amoebae of the strain *D*; one cyst is empty

Fot. 1. Formy wegetatywne szczepu *B* pełzaków
Fot. 2. Formy wegetatywne szczepu *D* pełzaków. Przy tylnym końcu pełzaka widoczna grudka zaglutynowanych bakterii
Fot. 3. Cysty szczepu *B*
Fot. 4. Cysty szczepu *D*; jedna cysta jest pusta



Phot. 5 i 6. Successive stages of formation of pseudopodia for food intake
Phot. 7. Amoeba ingesting a yeast cells
Contrast-phase microscope 900 ×

Fot. 5. i 6. Kolejne stadia tworzenia pseudopodiów, służących do pobierania pokarmu
Fot. 7. Pełzak pochłaniający komórki drożdży
Kontrast fazowy. Pow. 900 ×

spores are about half a size or smaller than those of the trophic forms, with a distinct small nucleolus visible in the contrast phase microscope (Phot. 3 and 4).

An exact classification of these organisms will be possible after the structure of the nucleus and the type of nuclear division have been examined (bassing on the work of Volkonsky, 1931 and Singh, 1950, 1951, 1952).

In our investigations we have used amoebae cultures on solid medium (1.5% agar, 0.5% NaCl, *pH* 6.8) and sometimes a culture on liquid media 3.0% Merck peptone, 0.5% glucose, 0.5% NaCl on tap water, *pH* 6.8). A suspension of cells of *A. aerogenes* killed by heating at 60°C for 0.5 hour was used as food. The culture was incubated at the temperature of 22°C or at a normal room temperature.

Bacteria. We used the following species of bacteria: *Aerobacter aerogenes* no. *14, Staphylococcus aureus* no. *2, Escherichia coli* no. *12, Proteus vulgaris* no. *40, Bacillus subtilis* no. *18, B. cereus* no. *56 (1010),* and *Procactinomyces* isolated from the soil, strain *46 (115).* Baker's yeast was also used (*Saccharomyces cerevisiae P Cz*) and distillers yeast *G 3.* The growth of bacteria on nutrient agar was suspended in physiological saline, was three times washed and used for the investigation. Yeast were cultured on wort agar.

The preparation of extracts from desintegrated cells of *A. aerogenes* and *S. cerevisiae* has already been described in the paper of Drożański (1961).

RESULTS

Dead bacteria as food for amoebae. In order to examine the suitability of dead microorganisms as food for amoebae microorganisms were killed: 1. by heating at temperature 100°C for 3-4 hours, 2. by heating at temperature 55-60°C for 1.5 hour, 3. *A. aerogenes* was killed by repeated freezing (about —60°) and thawing, by desiccation, 4. streptomycin (2000 γ per 1 ml of a 12-hour culture), 5. *S. aureus* was killed by adding 1000 units of penicillin per 1 ml of an eight hour culture.

The microorganisms thus killed were added to a culture of amoebae without bacteria, as their sole source of food. The results are given in Table I.

It was shown that grampositive bacteria (cocci and bacilli) killed by heating at of 100°C were sufficient food for amoebae. The amoeba grew as well as on bacteria killed at the temperature of 55-60°C. But they did not develop well on a medium where the only source of food were gramnegative bacteria, or yeast killed by heating at the temperature of 100°C. On the other hand gramnegative bacteria and yeast killed otherwise (see Table I) were readily ingested by amoebae.

Kunicki-Goldfinger *et al.* (1957) have already shown that the suspension of *A. aerogenes* killed either at the temperature of 70-75°C or with 1,5% phenol, 75% ethanol, or 2% phormol is useless as food.

Proactinomyces strain *46* was absolutely useless as food for amoebae, even when living.

Table I
Suitability of dead bacteria cells as food for amoebae
Bakterie zabite jako pokarm pełzaków glebowych

Strain of microorganisms	Method of killing	Degree of growth of amoebae	Strain of amoebae
A. aerogenes	temperature 100°	0	*B, D*
	temperature 55-60°	++++	*B, D*
	repeated freezing and thawing	++++	*B, D*
	streptomycin	+++	*B*
	dessication	+++	*B*
P. vulgaris	temperature 100°	0	*B, D*
	temperature 60°	+++	*B, D*
E. coli	temperature 100°	0	*B*
	temperature 60°	+++	*B*
S. aureus	temperature 100°	+++	*B, D*
	temperature 60°	+++	*B, D*
	penicillin	++	*B*
B. subtilis	temperature 100°	++++	*B*
B. cereus	temperature 100°	++	*B*
Proactinomyces	living	0	*B, D*
	temperature 60°	0	*B, D*
S. cerevisiae, P Cz	temperature 100°	0	*B, D*
	temperature 60°	++	*B*
	living	+++	*B, D*
S. cerevisiae, G 3	temperature 100°	0	*B, D*
	temperature 60°	++	*B*
	living	+++	*B, D*

The mechanism of ingesting food. We have ascertained that the examined soil amoebae in liquid or solid media with high moisture content ingested food — with the help of pseudopodia in the shape of a "goblet", produced at one end of the cell, opposite to the direction in which the amoeba moves (Phot. 5 and 6). These pseudopodia surround and engulf the liquid or solid food. In cultures on a dry solid medium the plasma is more dense, there is relatively narrow zone of ectoplasm and the pseudopodia for ingesting food are seldom produced. The development of amoebae is much slower in these conditions. The ingestion of food becomes difficult and occurs mostly in the ectoplasm. When moving in the medium the amoebae absorb the cells

they encounter (Phot. 7), but they do not absorb all kinds of cells. Sometimes they thrust back the encountered cells of bacteria or yeast and sometimes they only crawl over them. In these cases we do not

The effect of the extracts of disrupted *A. aerogenes* and *S. cerevsiae* cells on the growth of amoebae on bacteria killed at 100 C.

The factors that inhibited the development of amoebae in media, where the only source of food was a suspension of microorganism heated at 100°C, were examined. Further observations with the help of a contrast phase microscope on the ingestion by soil amoebae of yeast killed at the temperature of 100°C were made. The effect of an extract of desintegrated cells of *A. aerogenes* on this process was also studied.

A. aerogenes and *S. cerevisiae* cells were disrupted by repeated freezing (—60°) and thawing and than centrifuged. The extract thus received of *A. aerogenes* cells was denoted *WRKA* and the extract of yeast cells — *WRKD*. These extracts after sterilization were added to a suspension of cells of *A. aerogenes, P. vulgaris, E. coli, S. aureus, Proactinomyces* and yeast — strain *P Cz*, killed at the temperature of 100°C. As control we used the suspension of the above microorganisms living or dead (killed at 100°C) without *WRKA* and *WRKD*. For these experiments we used the vegetative forms of amoebae, from 5- day culture on liquid 3% per cent peptone in the presence of cells of *A. aerogenes*, killed at a temperature of 60°C. The amoebae were separated from medium and bacteria by centrifugation (500 rev. p. min.).

The results of three series of experiments are shown on Table II. Table II shows that the addition of *WRKA* and *WRKD* enables the amoebae to grow in the presence of microorganisms killed by heating at 100°C.

The number of ingested yeast cells killed at 100°C, in the presence of *WRKA* or without *WRKA* was measured in contrast phase microscope. Smears also were prepared on glasses covered with a thin coat of non-nutrient agar. A drop of yeast suspension and amoebae was put in the middle of the glass. The preparations were kept for appropriate time in high moisture conditions at the temperature of 22°C (see Table III) and then fixed with Carnoy's fixative.

The mean feeding index of amoebae and the mean index of utility of the extract of desintegrated cells of *A. aerogenes* (*WRKA*) was calculated from five series of experiments. The results are shown in Table III.

Table II

Influence of the extracts from *A. aerogenes* and *S. cerevisiae* cells on the growth of amoebae

Wpływ wyciągu z *A. aerobacter* i drożdży na wzrost pełzaków glebowych

Strains of microorganisms**	Number of amoebae cells*: on living bacteria		on bacteria killed at 100° C		on bacteria killed at 100° C + extract of *Aerobacter* cells		on bacteria killed at 100° C + extract of yeast cells
Days of incubation	3	5	3	5	3	5	5
A. aerogenes	15.2	54	0	1.2	1.1	14.5	9
P. vulgaris	22	84	0	2	—	15	—
E. coli	13.5	49	0	0.8	—	12	6
S. aureus	12	36	2.8	16	2.9	19	17
Proactinomyces	0	0	0	0	0	0	0
S. cerevisiae P Cz	8	38	0	0.6	0.9	9	8

Explanation: * — mean number of amoebae per microscopic field, calculated from 30 counts, ** — density of bacterial suspension varied from 10^7 to 10^8 cells per 1 ml.

Objaśnienia: * — średnia ilość pełzaków w polu mikroskopowym, ** — gęstość zawiesiny bakteryjnej wahała się między 10^7 a 10^8 komórek na 1 ml.

Table III

Influence of extract of desintegrated *A. aerogenes* cells on the ingestion of dead yeast cells

Wpływ wyciągu z komórek *A. aerobacter* na pochłanianie zabitych komórek drożdży przez pełzaki glebowe

Time in hours	Feeding index of amoebae * on yeasts killed at 100° C	on yeasts killed at 100° C + extract of *Aerobacter* cells	Utility index of extract of *Aerobacter* cells**
1	0.4	0.7	1.7
2	1.2	3	2.5
6	2.3	4.8	2.1

Explanation:

* — feeding index of amoebae = $\frac{\text{number of yeast cells ingested by amoebae}}{\text{number of amoebae investigated}}$

** — utility index of extract, of *Aerobacter* cells = $\frac{\text{feeding index of amoebae on yeast killed at 100° + extract of } \textit{Aerobacter} \text{ cells}}{\text{feeding index of amoebae on yeast killed at 100°}}$

Objaśnienia:

* — współczynnik pochłaniania drobnoustrojów przez pełzaki = $\frac{\text{ilość komórek drożdży pochłoniętych przez pełzaki}}{\text{ilość pełzaków badanych}}$

** — współczynnik aktywności wyciągu z komórek *A. aerobacter* = $\frac{\text{współczynnik pochłaniania zabitych drożdży w obecności wyciągu z } \textit{A. aerobacter}}{\text{współczynnik pochłaniania zabitych drożdży}}$

The stimulating effect of the extract of *A. aerogenes* cells (*WRKA*) on the ingestion of dead cells of yeast by amoebae was shown.

The attempt to substitute the extract of desintegrated *A. aerogenes* cells by horse serum or ovalbumin in 0.1 and 1.0 per cent concentrations met with failure. Neither did we get any positive results with the substitution of *WRKA* by vitamins (thiamine, riboflavine, panthotenic acid, biotine).

DISCUSSION

All examined strains of bacteria and yeasts were — when alive — excellent food for the examined soil amoebae. The only exception was *Proactinomyces* strain *46* (Table I).

These microorganisms could be used as food by the soil amoebae also when killed at the temperature 55-60°C. The grampositive bacteria killed at 100°C (*S. aureus* and both strains of bacilli) were also suitable as food for amoebae. The gramnegative bacteria (*A. aerogenes, P. vulgaris* and *E. coli*) killed at the same temperature and yeast were not ingested (Table I).

The effect of some bacterocidal factors in the "eadibility" of *A. aerogenes* and *S. aureus* for amoebae was then studied. *A. aerogenes* killed with streptomycin or repeated freezing and thawing or drying and *S. aureus* killed with penicillin were fed to amoebae. Bacteria thus killed were readily ingested by amoebae (Table I).

These results seem to suggest, that the method of killing the bacteria is one of the most important factors influencing the "eadibility" of bacteria.

The aim of a further experiment was to find the causes of unsuitability of bacteria killed at 100°C as food for amoebae. Suspension of yeasts and bacteria killed at 100°C were enriched with extracts from *A. aerogenes* and *S. cerevisiae* cells. It was shown that presence of microbial extracts made possible the utilization of microorganisms killed at 100°C as food for amoebae. (Table II).

This finding was confirmed by microscopic observations on the ingestion by amoebae of dead microorganisms in presence and absence of microbial extracts (Table III). Extracts stimulated the ingestion of microorganisms. It seems not improbable that microbial extracts acted on amoebae in similar manner, at least partly, as opsonins in the phenomenon of phagocytosis of bacteria by leucocytes.

It is also possible on the other hand, that *WRKA* contained some undispensable growth factors for amoebae, that were destroyed or made unaccessible by heating microorganisms at 100°C.

LITERATURE

Bakerspigel, A., 1956: Observations on the culture and maintenance of a free-living amoeba. *Can. J. Microbiol.*, **2**: 511.

Balamuth, W., Thompson, P. E., 1955: Comparative studies on amoebae and amoebicides, in Huntner S. H. and Lwoff A.: Biochemistry and physiology of protozoa. II Academic Press Inc., New York.

Brent, M. M., 1954: Nutritional studies on the ameboflagellate *Tetramitus rostratus., Biol. Bull.*, **106**: 262.

Castellani, A., 1930: An amoeba found in cultures of a yeast, acc. to Balamuth, W., Thompson, P. E., 1955.

Drożański, W., 1956: Fatal bacterial infection in soil amoebae., *Acta Microbiol. Polon.*, **5**: 315.

Drożański, W., 1961: The influence of bacteria on the excystment of soil amoebae. *Acta Microbiol. Polon.*, **10**: 147.

Dudziak, B., 1955: Kiełkowanie i wzrost ameb w zależności od pokarmu bakteryjnego. *Acta Microbiol. Polon.*, **4**: 115.

Hall, R. P., 1941: Food requirements and other factors influencing growth of *Protozoa* in pure cultures. in Calcins, G. N. and Sammers F. M.: *Protozoa* in biological research. Columbia University Press, New York.

Harrison, D. W., 1957: A technique for obtaining clone cultures of soil amoebae in sterile liquid medium., *Nature*, **180**: 1301.

Imszeniecki, A. A., 1947: Ekołcgija pigmientnych mikroorganizmow. II. Antagonisticzeskoje diejstwije pigmientow. *Mikrobiołogija*, **16**: 3.

Kunicki-Goldfinger, Wł., Drożański, W., Błaszczak, D., Mazur, J., Skibińska, J., 1957: Bakterie jako pokarm pełzaków, *Acta Microbiol. Polon.*, **6**: 331.

Lamy, L., Molinary, V., 1958: Étude expérimentale de l'activité de substances antibiotiques sur *Entamoeba histolytica* en culture dans ses rapports avec la flora bactérienne associée., *Ann. Inst. Pasteur.*, **94**: 655.

Lwoff, A., 1932: Recherches sur le nutrition des Protozaires, acc. to Balamuth, Thompson, 1955.

Mouton, H., 1902: Recherches sur la digestion chez les Amibes et sur leurs diastases intracellulaires., *Ann. Inst. Pasteur*, **16**: 457.

Neff, R. J., 1957: Purification, axenic cultivation, and description of a soil amoeba *Acantamoeba sp., J. Protozool.*, **4**: 176.

Neff, R. J., 1958: Mechanisms of puryfying amoebae by migration on agar surfaces., *J. Protozool.*, **5**: 226.

Oehler, R., 1916: Amöbenzucht auf reinem Boden, acc. to Halla, 1941.

Prescott, D. M., James, T. W., 1955: Culturing of *Ameba proteus* on *Tetrahymena., Exptl. Cell. Res.*, **8**: 256.

Ray, D. L., 1951: Agglutination of bacteria: A feeding method in the soil ameba *Hartmanella sp., J. Exp. Zool.*, **118**: 433.

Ray, D. L., 1954: *Hartmanella astronyxis*: a new species of free-living ameba., *J. Morphol.*, **95**: 159.

Singh, B. N., 1941: Selectivity in bacterial food by soil amoebae in pure and mixed culture and in sterilized soil., *Ann. appl. Biol.*, **28**: 52.

Singh, B. N., 1942: Selection of bacterial food by soil flagellates and amoebae., *Ann. appl. Biol.*, **29**: 18.

Singh, B. N., 1945: The selection of bacterial food by soil amoebae and the toxic effects of bacterial pigments and other products on soil *Protozoa.*, *Brit. J. exp. Path.*, **26**: 316.

Singh, B. N., 1950: A culture method for growing small free-living amoebae for the study of their nuclear division. *Nature*, **165**: 55.

Singh, B. N., 1951: Nuclear division in amoebae and its bearing on classification, *Nature*, **167**: 582.

Singh, B. N., 1952: Nuclear division in nine species of small free-living amoebae and its bearing on the classification on the order *Amoebida., Phil. Trans. Roy. Soc., London.*, **236**: 405.

Tsujitani, J., 1898: Ueber die Reinkulture der Amoeben., *Zentr. Bakter. I. O.* **24**: 666.

Volkonsky, M., 1931: *Hartmanella castellani* Douglas et classification des *Hartmanelles., Arch. Zool. Exptl.*, **72**: 317.

Wincenty Drożański i *Danuta Drożańska*

BAKTERIE MARTWE JAKO POKARM PEŁZAKÓW

Streszczenie

Wykazano, że wszystkie badane drobnoustroje, poza *Proactinomyces*, są odpowiednie jako pokarm dla pełzaków glebowych, zarówno żywe, jak i zabite przy pomocy antybiotyków, rozbicia komórki itd. Natomiast zabicie drobnoustrojów gramujemnych przez poddanie ich działaniu temperatury 100° czyni je nieprzydatnymi jako pokarm dla pełzaków.

Ekstrakty otrzymane z komórek *A. aerogenes* lub *S. cerevisiae*, uprzednio rozbitych przez wielokrotne zamrażanie, dodane do drobnoustrojów zabitych w temperaturze 100°, umożliwiają ich pochłanianie i wykorzystanie jako pokarmu przez pełzaki (tabele I, II i III, fot. 1-7).

Authors' address:
Adres autorów:
Mgr W. Drożański i mgr D. Drożańska, Zakład Mikrobiologii Ogólnej UMCS, Lublin, Al. Racławickie 20

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1961, 10 : 389 - 394

Józef Hałasa

NOWA METODA IZOLACJI MUTANTÓW *STREPTOMYCES*

Doniesienie I

Z Zakładu Mikrobiologii Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie

Wpłynęło dnia 10 listopada 1960 r.

Streszczenie

Podano opis nowej modyfikacji poszukiwania mutantów *Streptomyces*, tworzących sektory.

Przeważająca ilość prac nad mutantami u *Streptomyces* służy wyszukiwaniu mutantów antybiotycznie wydajnych. Poważnym utrudnieniem w tych pracach jest brak prostej i oszczędnej metody izolacji mutantów. Najczęściej stosowane są metody podane przez Kelnera (1949) lub ich modyfikacje. Metody te wymagają wiele pracy i dużych ilości pożywek. Wydaje się dlatego celowe podanie nowej, stosunkowo prostej metody izolacji mutantów, opartej na zasadzie odmiennej od dotąd stosowanych.

BADANIA WŁASNE

MATERIAŁ I METODY

Użyty do badań szczep *Streptomyces sp.* znaleziono jako zanieczyszczenie płytki agarowej. Szczep na podłożu ziemniaczanym dawał obfitą grzybnię powietrzną barwy biało-oliwkowej, z pojedynczymi rozgałęzieniami, o łagodnych falistych skrętach, z okrągłymi i owalnymi zarodnikami. Grzybnia podstawowa była koloru brązowego, z różnymi odcieniami od żółtego do brunatnego. Szczep hodowany zarówno na płytkach z podłożem Sabouraud, jak też w kolbach na podłożu płynnym, którego skład podaję poniżej, hamował niektóre gatunki grzybów, *B. subtilis* oraz *C. albicans*. Hamowanie wzrostu badano metodą kreskową i cylinderkową.

Do uzyskania mutantów użyto podłoża ziemniaczanego o składzie: odsączony wywar z ziemniaków, glikoza 1%, agar 2%, *pH* podłoża 7,0 oraz podłoża Sabouraud. Płytki średnicy 100 mm zawierały około 40 ml podłoża.

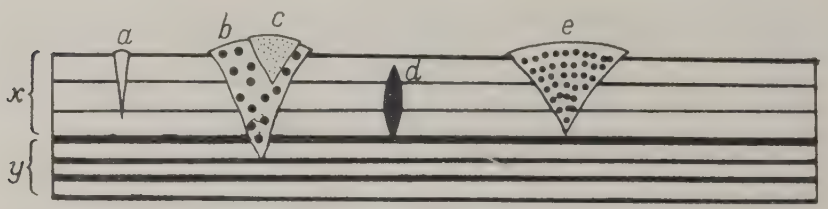
Badany szczep posiewano metodą kreskową, powszechnie stosowaną do wyszukiwania szczepów produkujących antybiotyki.

Wszystkie płytki posiewano zawiesiną zarodników zebraną z 10-dniowej hodowli na podłożu Sabouraud, wyprowadzonej z pojedynczej kolonii. Optycznie jednorodna zawiesina miała gęstość odpowiadającą nr 3 skali MacFarlanda. Bagietkę szklaną, zanurzoną uprzednio w zawiesinie, przeciągano jednym ruchem po powierzchni płytki, uzyskując przez to kreskę o równych brzegach i o równomiernym rozsianiu zarodników.

Do badań nad różnicowaniem mutantów użyto następujących podłoży: podłoże ziemniaczane, Sabouraud, agar z krwią, ziemniak w kawałku, marchew w kawałku oraz podłoże płynne o składzie: mąka sojowa 1,5%, glikoza 1,5%, NaCl 0,5%, $CaCO_3$ 0,4%, olej arachidowy 0,25% (*pH* podłoża 6,4-6,7).

WYNIKI

Na jednej z płytek zauważono w strefie wzrostu wtórnego pojawiające się po 14 dniach hodowli „kliny", o ostrzach zwróconych ku środkowi płytki. „Kliny" różniły się barwą grzybni i zawsze były wyraźnie odgraniczone (rys. 1). Stopień rozwarcia kątów tych „klinów" był różny. Niekiedy kliny miały kształt soczewki.



Rys. 1

X — strefa wzrostu wtórnego — secondary growth, *Y* — strefa wzrostu pierwotnego — primary growth, *a*, *b*, *c*, *d*, *e*, — różne formy „klinowatych" sektorów — various forms of mutant sectors

Posiano metodą kreskową 65 płytek z agarem ziemniaczanym oraz podłożem Sabouraud jednorodną zawiesiną zarodników badanego szczepu i poddano je różnym warunkom cieplnym. Stosowano trzy temperatury inkubacji: 37°, 23-28° i 13° w pierwszych 20 dniach hodowli, a 25° w dalszych 28 dniach. Wyniki tych badań przedstawia tabela I.

Jak wynika z tabeli I największa ilość „klinów" powstała w temperaturze 37°, przy czym nie stwierdzono w tej temperaturze istotnych różnic w ilości „klinów" powstałych na podłożu ziemniaczanym i Sabouraud. W temperaturach niższych znacznie więcej „klinów" powstawało na podłożu ziemniaczanym. W 37° pojawiał się najszybciej wzrost wtórny.

Tabela I

Wpływ podłoża i temperatury hodowli na powstawanie „klinów"
Effect of kind of medium and incubation temperature on the number of mutant-wedge-shaped sectors

Podłoże Medium	Temperatura hodowli Temperature of incubation	Ilość „klinów" na 5 płytkach po 48 dniach Number of mutant sectors on 5 plates after 48 days of incubation
S	23—28°	0
Z	23—28°	72
S	37°	242
Z	37°	258
S	13—25°	4
Z	13—25°	27

S — podłoże Sabouraud — Sabouraud medium,
Z — podłoże ziemniaczane — Potato agar.

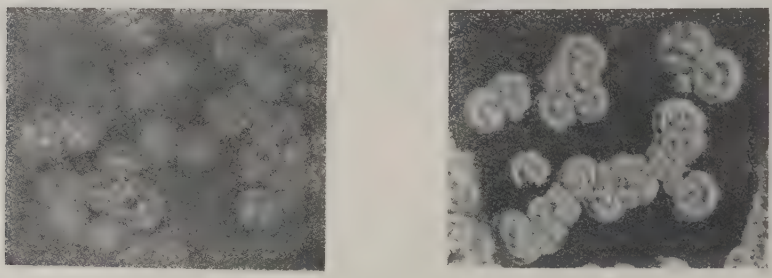
W okresie inkubacji w 13° wzrost był słaby i nie spostrzegano w nim „klinów". Po zmianie temperatury hodowli na 25° pojawił się obfity wzrost wtórny, niekiedy większy od przeciętnego. Ilość „klinów" była tu jednak mała, 4 i 6.

Dalszym etapem pracy były badania nad cechami odróżniającymi „kliny" od szczepu macierzystego, oraz cechami różniącymi „kliny" między sobą. Zarodniki z 14 wyraźnych „klinów" z różnych płytek przesiano na agar ziemniaczany celem izolacji do dalszych badań. Dla kontroli posiano dwie próbki zarodników pobranych z niezróżnicowanej strefy wzrostu wtórnego i jedną próbkę z niezróżnicowanej strefy wzrostu pierwotnego. Próbki z „klinów" oznaczono kolejnymi literami alfabetu od *A* do *M*.

Na wszystkich płytkach kontrolnych zasianych materiałem ze stref niezróżnicowanych wyrosły kolonie nie różniące się między sobą i identyczne z koloniami szczepu wyjściowego. Na 14 płytkach, na które wysiano „kliny", uzyskano natomiast 13 różnych typów kolonii, różniących się między sobą wielkością, budową, szybkością wzrostu, obfitością i barwą grzybni podstawowej i powietrznej, wydzielaniem barwnika oraz głębokością wrastania grzybni podstawowej w podłoże (fot. 1). Cechy różniące „kliny" utrzymywały się w dalszych ośmiu pasażach.

Ze stosowanych podłoży stałych najlepsze okazało się podłoże ziemniaczane. Uzyskiwano na nim najobfitszy wzrost i najwyraźniejsze różnice między wariantami. Na agarze z krwią wzrost był najsłabszy; pośrednie miejsce zajmowało podłoże Sabouraud. Na ziemniaku i marchwi w kawałku nie wszystkie szczepy wyrastały. W hodowli

płynnej wszystkie warianty, z wyjątkiem *A* i *F*, rosły podobnie jak kontrole na powierzchni w postaci obfitej grzybni. Wzrost ten w temperaturze 28° pojawiał się zwykle na trzeci dzień. Warianty *A* i *F* wyrastały w postaci nielicznych kolonii pływających, przypominających swoim wyglądem kolonie uzyskane na podłożu stałym. Kolonie te pojawiały się u warianta *A* w 9, u warianta *F* w 16 dniu hodowli.



a b

Fot. 1. Różne typy kolonii mutantów, wyizolowanych z sektorów
a — mutant *A*, b — mutant *K*
Phot. 1. Various types of growth of different mutants isolated from sectors
a — mutant *A*, b — mutant *K*

W toku dalszych obserwacji okazało się, że warianty *Ł* i *M* są identyczne. Wariant *F* wyróżnia się spośród wszystkich tym, że bardzo słabo zarodnikuje, a niekiedy w ogóle nie tworzy konidii. Podobnie zachowuje się wariant *A*, zarodnikuje jednak nieco obficiej.

DYSKUSJA

„Kliny" charakteryzują się wieloma trwałymi cechami, utrzymującymi się w 8 kolejnych pasażach. Niektóre z tych cech (tworzenie grzybni powietrznej i jej barwa oraz wydzielanie barwika do podłoża) uważa się za istotne w określaniu gatunków *Streptomyces* (Krasilnikow, 1960a, b). W dostępnej literaturze nie znalazłem opisu „klinów", natomiast liczni autorzy obserwowali tzw. kolonie sektorowe (Kelner, 1949; Paldrok, 1953; Gray i współpr., 1957). Sektory takie swoim wyglądem bardzo przypominają „kliny". Wydaje się również, że mechanizm powstawania „sektorów" i „klinów" jest podobny: w określonym miejscu rozwijającej się kolonii następuje mutacja. Jednakże mutanty w koloniach mają inne warunki rozwoju niż we wzroście „kreskowym". Kolonie rozwijają się od centrum ku obwodowi, każdy następny obwód jest większy od poprzedniego i mnożące się komórki mogą zajmować coraz większą przestrzeń. W wy-

padku gdy mutant ma większą od otoczenia zdolność opanowywania środowiska, zajmie większy wycinek koła niż normalny osobnik z tego poziomu; gdy zdolność ta jest mniejsza, zajmie wycinek mniejszy. W posiewie „kreskowym" natomiast mutant wtedy tylko będzie mógł wytworzyć „klin" gdy będzie rozwijał się szybciej niż szczep macierzysty. W tych warunkach uwidacznia się tylko niektóre mutanty. Wydawać by się zatem mogło, że do uzyskania mutantów bardziej nadają się kolonie. Trzeba jednak pamiętać, że na „kreskę" wysiać można dużą ilość zarodników, co daje znacznie większą szansę uzyskania mutantów niż przy wysiewie pojedynczych zarodników.

Opisane tutaj „kliny" izolowano ze strefy wzrostu wtórnego, mimo że obserwowano wychodzenie ich także ze strefy wzrostu pierwotnego.

Prace przeprowadzane na bakteriach wykazały pewne różnice form powstałych w strefie wzrostu pierwotnego i wtórnego (Kunicki-Goldfinger i Rowiński, 1957). U opisanego szczepu *Streptomyces* stwierdzono jedynie znaczne różnice form pochodzących z różnych „klinów", nie stwierdzono natomiast różnic pomiędzy formami powstałymi w niezróżnicowanych strefach wzrostu pierwotnego i wtórnego.

Nie zauważono zależności liczby „klinów" od szerokości strefy wzrostu wtórnego. Zależność od temperatury występuje natomiast wyraźnie. Ogólnie można powiedzieć, że warunki hodowli umożliwiające szybszy wzrost dawały większą ilość „klinów" i wczesne ich pojawianie się (po 7-10 dniach).

Na uwagę zasługuje fakt, że uzyskiwano liczne mutanty bez stosowania jakichkolwiek bodźców sztucznych, co potwierdza spostrzeżenia innych autorów dotyczące zmienności rodzaju *Streptomyces* (Krasilnikow, 1960 a, b).

Występowanie „klinów" nie ogranicza się do opisanego szczepu. Świadczą o tym pewne — jak dotąd fragmentaryczne — obserwacje, wymagające jeszcze potwierdzenia na większym materiale.

Wyszukiwanie mutantów za pomocą izolacji „klinów" jest metodą prostszą od dotąd stosowanych. Można by się nią posługiwać w izolacji mutantów o pewnych określonych cechach, jak np. wytwarzanie antybiotyków, mogłaby też ona być przydatna w badaniach genetycznych, ponieważ umożliwia równoczesne wysianie dużej ilości materiału.*

* Panu drowi J. Mitręzie składam serdeczne podziękowanie za wykonanie fotografii.

LITERATURA

Gray, M. L., Stafseth, H. J., Thorp, F. jr, 1957: Colonial dissociation of *Listeria monocytogenes*. *Zentr. Bakter. I. O.*, **169**: 378.

Kelner, A., 1949: Studies on the genetics of antibiotic formation: the induction of antibiotic-forming mutants in actinomycetes. *J. Bact.*, **57**: 73.

Krasilnikow, N. A., 1960a: Taxonomic principles in the actinomycetes. *J. Bact.*, **79**: 65.

Krasilnikow, N. A., 1960b: Rules for the classification of antibiotic producing actinomycetes. *J. Bact.*, **79**: 74.

Kunicki-Goldfinger, W., Rowiński, S., 1957: Przyczynek do poznania budowy kolonii bakteryjnej. *Acta Microbiol. Polon.*, **6**: 321.

Paldrok, H., 1953: On the variability and classification of dermatophytes. *Acta Dermato-Venerologica*, **33**: 1.

Józef Hałasa

A NEW METHOD FOR THE ISOLATION OF MUTANTS OF *STREPTOMYCES*

Summary

A new method for the isolation of mutants is described. The method is based on the observation of wedge-shaped sectors, appearing in cultures of a *Streptomyces* on solid media. Subcultures of spores from different wedge-shaped sectors have properties which distinguish them from parent strain and from subcultures of other sectors. The difference in type of growth, the stability of these different forms in several subcultures and the mode of origin of the sectors lead to the conclusion that they represent mutants of the parent strain.

The described method may be useful for a fast and economical isolation of mutants.

Author's address:
Adres autora:
Józef Hałasa,
Szczecin, Al. Powstańców 72,
Pomorska Akademia Medyczna,
Zakład Mikrobiologii

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1961, 10 : 395 - 402

Władysław Myśków

THE INFLUENCE OF BACTERIA DISSOLVING PHOSPHATES ON THE AVAILABILITY OF PHOSPHORUS TO PLANTS

From the Department of Soil Microbiology, IUNG, Puławy

Received 10th June 1960

Summary

The release of phosphorus from tricalcium phosphate by bacteria able to dissolve this compound on synthetic media, was slight or did not appear at all in natural soil conditions.

In some of the pot experiments with oats and barley the crop increased from 7 to 25 p. c. under the influence of inoculation with bacteria dissolving calcium phosphate. However this increase seemed notable, the yields on phosphorite were always very small as compared with yields on superphosphate.

Phosphorus occurs in soils in large quantites: 300-6000 kg P_2O_5 per 1 ha (Prianisznikow, 1952), all the same it is not easily accesible to plants. There is often relative deficit of phosphorus, although for a good crop only 30-60 kg P_2O_5 per ha is needed. Therefore investigations on the biological release of phosphorus in the soil from its unavailable compounds are important.

Some pot experiments were carried out in the last years in which the effect of inoculation of crop plants with microorganisms dissolving calcium phosphates was studied. Positive results in such pot experiments were obtained by Pikowskaja (1948), Bieriozowa *et al.* (1956), Uarowa (1956), Leszlo and Pop (1957). On the other hand Kuryłowicz and Kermen (1957) did not find any distinct effect of such an inoculation. Kreybig (1953, 1954) has tried to ascertain optimal conditions for releasing phosphorus from unavailable phosphates by native soil microflora.

LABORATORY EXPERIMENTS

MATERIAL AND METHODES

Two strains of bacteria from our collection were examined: no. *13* (*Pseudomonas sp.*) and no. *14* (*Achromobacter sp.*) (M y ś k ó w, 1960) — dissolving with different intensity unavailable calcium phosphates in synthetic media. Pot experiments were conducted in order to investigate the influence of inoculation with these bacteria on the crop yields and on availability of phosphorus to plants.

RESULTS AND DISCUSSION

The ability of examined strains to release phosphate from tricalcium phosphate or from phosphorite meal was studied in natural soil media (sand or peat). 300 ml Erlenmayer flasks were filled with ca 100 g of loamy sand or ca 50 g of peat and 1.5 per cent of Polish phosphorite (containing 14.4 per cent of total P_2O_5) was added. The moisture of the soils was maintained at the level of 60-70 per cent of its total water holding capacity. 10 ml of water suspension of bacterial cells of strains no. *13* or no. *14* was introduced per each flask in the inoculated series. The soil cultures were kept 4 months at 28-30°C.

A very slight or no influence on releasing phosphorus in these soils was noted in this experiment. A better solubilization of phosphorus from tricalcium phosphate was caused only by strain no. *14* after enrichment of the sand with 1 per cent of glucose. The release of phosphorus from phosphorite in the same conditions was but slight. Some results of this experiment are given in table I.

In sand enriched with glucose and tricalcium phosphate (not sterilized series) the amount of phosphorus dissolved by strain no. *14* decreased after 40 days of incubation. This was probably due to the reasimilation of this component by moulds.

On the peaty soil no influence of strain no. *14* was observed, even after the addition of glucose. Neither was it found when phosphorite mixed with farm-yard-manure was added to quartz sand or in a compost obtained from peat, farm-yard-manure and phosphorite meal.

POT EXPERIMENTS

METHODS

9 pot experiments were carried out during the years 1955-1957. In some of the experiments bacteria mineralizing organic phosphorus compounds were introduced to soil. Barley, oats and flax were chosen because of their different phosphate requirement. Mineral soils (sand

Table I

The effect of inoculation with the strain no. *14* on the dissolving of calcium phosphates in sand. Laboratory experiment

Wpływ szczepienia szczepem nr *14* na rozpuszczanie trudno przyswajalnych fosforanów wapnia w piasku. Doświadczenie laboratoryjne

Series		Amount of water soluble P (as P_2O_5) mg per 100 g of sand			
		after 5 days of incubation		after 39 days of incubation	
		soil not sterilized	soil sterilized	soil not sterilized	soil sterilized
Sand + glucose + $Ca_3(PO_4)_2$	not inoculated	19.82	22.44	17.82	18.54
	inoculated	61.00	82.00	38.54	84.00
Sand + $Ca_3(PO_4)_2$	not inoculated	16.00	20.49	17.82	17.45
	inoculated	16.00	20.00	18.54	17.09
Sand + glucose + phosphorite	not inoculated	6.66	9.33	7.67	9.33
	inoculated	7.33	10.33	10.00	11.33
Sand + phosphorite	not inoculated	6.00	7.33	8.00	7.33
	inoculated	6.66	8.16	8.00	7.67

Table II

The effect of inoculation with the strain no. *14* upon the yield of barley. Pot experiment on sand

Wpływ szczepienia szczepem nr *14* na plon jęczmienia. Doświadczenie wazonowe na piasku

Phosphorus fertilizing	Strain	Air dried yield of barley g per pot	Amount of P_2O_5 in barley yield mg per pot
Without phosphorus fertilizing	not inoculated	2.97	8.7
	inoculated	3.35	8.7
Phosphorite	not inoculated	3.18	9.7
	inoculated	3.41	8.3
Phosphorite + glucose	not inoculated	2.87	7.4
	inoculated	3.26	8.2

Confidence probability $P = 0.95$
Interval of confidence $\mu t = 0.237$

with glucose or loamy sand alone) and organic soils (peat and muck soil) were used. Phosphorus was applied in the form of phosphorite, apatite or bone meal (0.2-0.7 g of P_2O_5 per pot containing about 8 kg of soil). As control superphosphate in an equivalent quantity of P_2O_5 was given.

RESULTS

In our first experiment with barley on sand with phosphorite, inoculation with strain no. *14* caused some increase of crop (table II), amounting to 7-13 per cent.

The uptake of phosphorus from phosphorites was yet as slight in the inoculated plants as in the control.

In the experiments with oats (table III) on peaty soil the inoculation showed a more positive influence.

Table III

The effect of inoculation with bacteria dissolving $Ca_3(PO_4)_2$ upon the yield of oats. Pot experiment on peat

Wpływ szczepienia bakteriami „fosforowymi" na plon owsa. Doświadczenia wazonowe na torfie

Series	Air dried yield of oats, g per pot			Amount of P_2O_5 in plant yield, mg per pot	Amount of N in plant yield, mg per pot
	seeds	straw	together		
Superphosphate	7.98	10.82	18.80	55.1	152
Without phosporus fertilizing	2.09	3.85	5.94	12.9	67
Phosphorite	2.05	3.98	6.03	14.7	73
Phosphorite + + strain no. *13*	2.46	4.69	7.15	16.0	82
Phosphorite + + strain no. *14*	2.93	5.13	8.06	29.0	101
Interval of confidence μt	1.156	0.939	1.717		

Confidence probability $P = 0{,}95$

The yield of oats on peaty soil with phosphorite increased by 25 per cent due to inoculation with strain no. *14*. At the same time a higher content of phosphorus and nitrogen was found in inoculated plants. The yield obtained on phosporite was non the less much smaller than in controls grown on superphosphate. The strain no. *13* was

less active in that respect in all experiments. No effect of inoculation was observed in flax on peaty soil.

Special trials were done to ascertain the influence of the term of inoculation of oats sown on muck soil. Soil was inoculated 1 month before sowing, together with seeds, or during their germination. The yields of oats from all these series are shown in table IV.

Table IV

The effect of the time of inoculation upon the yield of oats. Pot experiment on muck soil

Wpływ terminu stosowania szczepionek na plon owsa. Doświadczenie na murszu

No. of strain	Time of soil inoculation	Air dried yield of oats: seeds	straw	together	Amount of P_2O_5 in plant yield mg per pot
		g per pot			
	Not inoculated	18.25	21.89	40.14	165.6
Strain no. *13*	1 month before sowing	18.18	21.59	39.77	149.0
	seed inoculation	19.29	23.45	42.74	157.0
	10 days after germination	19.48	23.79	43.27	167.6
Strain no. *14*	1 month before sowing	19.65	24.50	44.15	151.2
	seed inoculation	19.61	24.49	44.10	161.0
	10 days after germination	18.30	22.92	41.22	158.9
Interval of confidence μt		1.133	1.408	2.175	

Confidence probability $P=0,95$

Phosphorus source —phosporite in amount 1.5 g per pot
Źródło fosforu — mączka fosforytowa, w ilości 1.5 g na wazon

Strain no. *14* when introduced into the soil before sowing or given together with seeds had a slight effect (ca 10 per cent increase of yield). Strain no. *13* had a still weaker influence (ca 6-8 per cent increase). The best results were noted when seeds were inoculated after their germination. The amount of phosphorus in plants however did not increase.

Plate count was made with samples of sand and peaty soil from the pot experiments. Typical results are given in table V.

It was shown that the number of these bacteria was much higher in inoculated soils than in the control.

Table V

Per cent microorganisms dissolving calcium phosphates in sand under barley* Procent drobnoustrojów rozpuszczających fosforany wapnia w piasku pod jęczmieniem**

Strain	Phosphorite dissolution				Phosphorite — glucose dissolution			
	strong	moderate	slight	together	strong	moderate	slight	together
11 days after germination								
Not inoculated	0	24	12	36	13	48	22	83
Strain no. *14*	82	0	14	96	100	0	0	100
20 days after germination								
Not inoculated	0	4	12	16	0	10	26	36
Strain no. *14*	71	4	4	79	30	10	10	50

* In relation to total number of microorganisms.
** W stosunku do ogólnej liczby drobnoustrojów.

LITERATURE

Bieriozowa, E. F., Uarowa, W. N., Niestierowa, G. H., Niestierowa, E. J., 1956: Ispolzowanije baktierij rasszczeplajuszczich triochkalcyniewyj fosfat dla ułuczszenija fosfornogo pitanija rastienij i powyszenija effiektiwnosti fosforitnoj muki. *Biul. Naucz. Inform. sielchoz. mikrobioł.*

Kreybig, L., 1953: Die biologische Aufschliessung und praktische Anwendung von mineralischen Rohphosphaten, *Acta Agronom. Acad. Sci. Hung*, 3.

Kreybig, L., 1954: Neuere biologische Düngemittel und Düngungsmethoden. *Deutsche Landwirtsch.*, **12**: 601.

Kuryłowicz, B., Kermen, J., 1957: Doświadczenia wstępne nad poszukiwaniem bakterii glebowych udostępniających roślinom fosfor z trudno rozpuszczalnych fosforanów. *Zesz. Nauk. SGGW, Rolnictwo*, **1**: 75.

Leszlo, G., Pop, Cl., 1957: La mobilisation des phosphates par certaines espèces de microorganismes. Symp. Meth. d'Etud. Microbiol. du Sol, 6.

Myśków, W., 1960: The dissolving of calcium phosphate by some soil bacteria. *Acta Microbiol. Polon.*, **9**: 367.

Pikowskaja, R. I., 1948: Mobilizacyja fosfatow w poczwie w swiazi z żyzniediejatielnostju niekotorych widow mikrobow, *Mikrobiołogija*, **18**: 362.

Prianisznikow, D. N., 1952: Agrochimija. Moskwa.

Uarowa, W. N., 1956: Baktierii razłagajuszczije triochkalcyniewyj fosfat. *Dokł. WASChNIŁ*, **6**: 22.

Władysław Myśków

WPŁYW BAKTERII ROZPUSZCZAJĄCYCH FOSFORANY WAPNIA NA UDOSTĘPNIANIE FOSFORU ROŚLINOM

Streszczenie

W pracy tej starano się określić wpływ dwóch wybranych szczepów bakterii, rozpuszczających na pożywkach syntetycznych fosforany wapnia, na udostępnianie roślinom fosforu. Przeprowadzono 9 doświadczeń wazonowych (1955-57), stosując w nich wybrane szczepy bakterii jako szczepionki. Roślinami doświadczalnymi były: jęczmień, owies i len, jako rośliny różnie reagujące na brak przyswajalnego fosforu w glebie. Nawozy fosforowe używano w postaci mączki fosforytowej, apatytowej i kostnej. W czasie wegetacji roślin sprawdzono żywotność stosowanych szczepionek w glebie pod roślinami.

Stwierdzono, że w warunkach przeprowadzonych doświadczeń wegetacyjnych działalność tych bakterii była słaba lub nie wystąpiła wcale. Uruchamianie fosforu silniej przejawiło się na torfie — w doświadczeniu z owsem. Stosowane jako szczepionki bakterie dobrze rozwijały się pod roślinami zarówno w podłożach mineralnych jak i organicznych. Wydaje się, że wpływ na rozwój tych organizmów mógł wywierać okres wegetacyjny roślin.

Author's address:
Adres autora:

Dr Władysław Myśków,
Zakład Mikrobiologii Gleby IUNG,
Puławy

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1961, 10 : 403 - 408

Stanisław Bujak

WSTĘPNE BADANIA NAD SYNTEZĄ KAROTENÓW PRZEZ RÓŻNE SZCZEPY DROŻDŻY *RHODOTORULA*

Z Zakładu Technologii Rolnej Wyższej Szkoły Rolniczej w Lublinie

Wpłynęło dnia 15 maja 1961 r.

Streszczenie

Spośród czterech zbadanych gatunków *Rhodotorula* najwięcej czynnych biologicznie karotenów wytwarzają szczepy *Rh. aurantiaca* (do 169γ na 1 g suchej masy).

W ostatnich latach obserwuje się wśród badaczy znaczne zainteresowanie organizmami syntetyzującymi pigmenty o barwie żółtej lub czerwonej. Przedmiotem badań były przede wszystkim pigmenty: *Rhodospirillum, Rhodopseudomonas, Sarcina, Neurospora, Phycomyces* i *Rhodotorula.* Okazało się, że w ich skład wchodzą, w zależności od rodzaju organizmu, różne karotenoidy: spirilloksantyna, neurosporoksantyna, rubiksantyna, fitoen, likopen, torulen oraz α-, β- i γ-karoteny (Goodwin i Land, 1956; Goodwin i Jamikorn, 1956; Skoda, 1951; Wittmann, 1957).

Dworkin (1959) próbował wyjaśnić znaczenie karotenoidów u fotosyntetyzujących bakterii, natomiast Goodwin i współpracownicy (1955, 1956), Praus i Dyr (1955) oraz Dyr i Praus (1955), Zalokar (1957) i wielu innych badali mechanizm i optymalne warunki tej syntezy, głównie u *Phycomyces, Neurospora* i *Rhodotorula.* Chociaż nie wyjaśniono jeszcze mechanizmu syntezy karotenoidów u drobnoustrojów, to jednak określenie warunków sprzyjających tej syntezie ma doniosłe znaczenie dla praktyki ze względu na możliwości wykorzystania jako pokarmu dla ludzi i paszy dla zwierząt drobnoustrojów gromadzących w swoich komórkach karoteny biologicznie czynne to znaczy takie, które mogą w organizmach zwierząt ulegać zamianie na witamin *A.*

Te uzdolnienia drobnoustrojów próbował wykorzystać Ishii ze współpracownikami (1953, 1954 a, 1954 b) w celu wzbogacania pożywienia i paszy w witamin *A* i inne substancje biologicznie czynne. Kurczęta żywione przez nich paszą wzbogaconą dodatkiem zarodnikującej grzybni *Neurospora sitophila* miały znacznie wyższe przyrosty wagi ciała niż kontrolne. Do podobnych celów można użyć i inne organizmy, jak np. drożdże *Rhodotorula*, które wytwarzają obok torulenu również i karoten. *Rhodotorula* gromadzą w komórkach znaczne ilości białka i tłuszczu, który wg Kleinzellera (1947) składem chemicznym i własnościami fizycznymi przypomina oleje roślinne.

Celem tej pracy było poszukiwanie szczepów drożdży z rodzaju *Rhodotorula* zdolnych do syntezy znacznych ilości karotenów, aby pozyskane szczepy użyć do produkcji drożdży paszowych.

BADANIA WŁASNE

METODY

Do badań użyto szczepy *Rhodotorula* wyosobnione z powietrza, gleby i kiszonek pastewnych. Szczepy te poddano szczegółowym badaniom diagnostycznym wg Lodder i Kreger van Rij. Hodowle szczepów prowadzono na wytrząsarce przez 36 godzin w temperaturze 28-30° na pożywce z sacharozą wg Prausa i Dyra (1955) o *pH* 6,8-7,0. Po zakończeniu hodowli trzecią jej część przeznaczono do oznaczania plonu suchej masy, a dwie trzecie do oznaczenia zawartości karotenów. Proces hydrolizy drożdży i wydzielania karotenów z hydrolizatów wykonywano wg metody podanej w pracy Dyra i Prausa (1955). Z wyciągu zawierającego różne karotenoidy oddzielono karotenoidy biologicznie nieczynne 90% wodnym roztworem metanolu, a w pozostałej eterowej frakcji oznaczano karoteny przy pomocy fotokolorymetru Pulfricha, stosując filtr S-47. Uzyskane wyniki z pomiarów ekstynkcji porównywano z prostą wykreśloną na podstawie ekstynkcji wzorcowych roztworów β-karotenu.

WYNIKI BADAŃ

Ogółem zbadano 21 szczepów, zaliczonych do następujących gatunków: 13 do *Rh. mucilaginosa*, 4 do *Rh. glutinis*, 2 do *Rh. rubra* i 2 szczepy do *Rh. aurantiaca*.

Wyniki prowadzonych hodowli oraz oznaczeń zawartości karotenów w plonie suchej masy drożdży zebrano w tabeli I. Najlepsze wyniki uzyskano ze szczepami *Rh. aurantiaca*, które dawały najwyższy plon suchej masy i zawierały najwięcej karotenów w suchej masie drożdży. Niski plon karotenów, szczególnie u *Rh. rubra* i *Rh. mucilaginosa*, wynikał z niewielkiego przyrostu biomasy drożdży i niskiej zawartości karotenów w jednostce wagowej suchej masy (tabela II). Być może, że skład chemiczny użytego podłoża nie odpowiadał w równym stopniu wszystkim użytym szczepom i należałoby dobierać skład

Tabela I

Zawartość karotenów w plonie suchej masy różnych szczepów drożdży *Rhodotorula*

Content of carotenes in dry mass of yeast cells in different *Rhodotorula* strains

Gatunek Species	Symbol szczepu Strain	Plon sucha masa drożdży (g) dry mass (g)	Yield karotenów γ carotenes γ	Karotenów w suchej masie na 1 g Carotenes in dry mass per 1 g
Rh. mucilaginosa	*4*	0,4622	20,7	44,8
	2	0,3674	18,0	48,9
	S17	0,3460	12,4	35,7
	P1	0,3906	19,2	49,1
	3	0,4790	22,0	46,1
	S11	0,2628	12,7	48,2
	Rh10	0,1060	8,8	82,9
	Rh12	0,2088	14,0	67,2
	S12	0,2995	3,4	11,5
	B11	0,2400	3,5	14,6
	Sz1	0,3584	11,9	33,3
	P3	9,2245	9,0	40,0
	Rh5	0,3905	5,7	14,7
Rh. rubra	*glm*	0,3548	22,3	62,9
	W12	0,2404	9,3	39,9
Rh. glutinis	*Rh6*	0,4780	50,6	105,8
	49	0,4526	34,5	76,2
	Rh7	0,3674	50,0	136,2
	5	0,2272	27,9	122,9
Rh. aurantiaca	*Rh3*	0,4890	83,0	169,8
	Rh1	0,4848	67,9	140,0

Tabela II

Średni plon suchej masy drożdży i karotenów

Average yield of dry mass of yeast and carotenes

Gatunek drożdży Species	Średni plon Average yield				Ilość karotenów w 1 g suchej masy Carotenes per 1 g of dry mass	
	s. masy dry mass		karotenów carotenes			
	g	procent per cent	γ	procent per cent	γ	procent per cent
Rh. aurantiaca	0,4869	100	75,4	100	154,9	100
Rh. glutinis	0,3813	78	40,8	54	110,3	71
Rh. rubra	0,2975	61	25,8	21	50,9	32
Rh. mucilaginosa	0,3181	65	12,4	16	41,0	26

podłoża przynajmniej dla każdego gatunku drożdży, aby uzyskać wyższe plony biomasy i karotenów.

W tabeli II podano średni plon suchej masy drożdży i karotenu dla każdego gatunku. W porównaniu do *Rh. aurantiaca* różnice w plonach karotenu pomiędzy pozostałymi gatunkami były znacznie większe, niż różnice w plonach suchej masy drożdży.

WNIOSKI

1. Badane szczepy drożdży *Rhodotorula* wykazywały znaczne różnice w uzdolnieniach do syntezy karotenów. 2. Plon karotenów zależał od przyrostu biomasy drożdży i zawartości tego składnika w suchej masie. 3. Najbardziej przydatne do syntezy karotenów okazały się szczepy *Rh. aurantiaca*. Dawały one 30-75% wyższe plony karotenów niż *Rh. glutinis* i *Rh. mucilaginosa*. 4 Dla produkcji na skalę techniczną należałoby szczegółowo określić optymalne warunki dla syntezy biomasy i karotenów. Zagadnienie to będzie tematem dalszych prac.

LITERATURA

Dworkin, M., 1959: Function of carotenoids in photosynthetic bacteria. *Nature*, **184**: 1891.

Dyr, J., Praus, R., 1955: Biosynthesa karotenoidu v kvasince *Rhodotorula gracilis* III. Vliv různých zdrojů dusíku, *pH*, a poměru dusíku k uhlíku v živné půdě na tvorbu karotenoidu. *Chem. listy*, **49**: 1699.

Goodwin, T. W., Jamikorn, M., 1956: Carotenoid production by a strongly chromogenic bacterium isolated from butter. *Biochem. J.*, **62**: 257.

Goodwin, T. W., Land, D. J., 1956: Carotenoids of some species of *Chlorobium*. *Biochem. J.*, **62**: 553.

Ishii, R., Iwagaki, C., 1953: Studies on the manufacture of caroten fortified foods by *Neurospora*. *J. Ferment. Technol.* **31**: 471, **32**: 238.

Ishii, R., 1954: Studies on the production of carotene by the microorganisms. *J. Ferment. Technol.*, **32**: 231.

Ishii, R., Kondo, K., Noguchi, Y., 1954 b: Studies on *Neurospora* as a food supplement. *J. Ferment. Technol.* **32**: 478.

Kleinzeller, A., 1947: Fat production from yeast. *Fourth Intern. Congr. Microbiol. Copenhagen:* 544.

Praus, R. i Dyr, J., 1955: Biosynthesa karotenoidu v kvasince *Rhodotorula gracilis* IV. Tvorba karotenoidu z ruzných zdrojů uhlíku. *Chem. listy*, **49**: 1703.

Skoda, J., 1951: Isolace torulenu a vliv kultivaceni teploty na poměrné množství torulenu k ostatním karotenoidům *Rhodotorula gracilis*. *Chem. listy*, **45**: 91.

Wittmann, H., 1957: Changes in carotenes of *Rhodotorula rubra* in different conditions of growth. *Arch. Mikrobiol.*, **25**: 373.

Zalokar, M., 1957: Variations in the production of carotenoids in *Neurospora* *Arch. Biochem. Biophys.*, **70**: 561.

Stanisław Bujak

PRELIMINARY STUDIES ON CAROTENE SYNTHESIS BY DIFFERENT STRAINS OF *RHODOTORULA*

Summary

The ability to carotene synthesis of 21 strains of yeasts (13 strains of *Rhodotorula mucilaginosa*, 4 *Rh. glutinis*, 2 *Rh. rubra* and 2 *Rh. aurantiaca*) was studied. Cultures were grown in fluid saccharose medium for 36 hours on shaker at 28-30°C.

The best results in carotene production were obtained with strains of *Rh. aurantiaca* which contained an average of 155 γ of carotenes per 1.0 g of dry cell mass. The smallest amounts of these substances were found in *Rh. mucilaginosa* (about 12 γ per 1.0 g of dry cells).

The yield of carotenes was dependent on the increase in dry mass of yeasts. The greatest increase in yield of dry mass was observed in *Rh. aurantiaca*.

Adres autora:
Author's address:

Doc. Dr S. Bujak,
Zakład Technologii Rolnej WSR,
Lublin, ul. Króla Leszczyńskiego 9

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1961, **10** : 409 - 416

Stanisław Bujak i *Wiesław Dąbkowski*

ROZKŁAD KWASU JABŁKOWEGO PRZEZ DROŻDŻE *SCHIZOSACCHAROMYCES ACIDODEVORATUS* W RÓŻNYCH WARUNKACH FERMENTACJI

Z Zakładu Technologii Rolnej Wyższej Szkoły Rolniczej w Lublinie

Wpłynęło dnia 15 maja 1961 r.

Streszczenie

Drożdże *Schizosaccharomyces acidodevoratus* rokładają kwas jabłkowy w 75-80%. Proces ten jest niewrażliwy na stężenie kwasu (do 1,5%), cukru (do 30%) oraz alkoholu (do 10%).

Proces biologicznego odkwaszania moszczów i win obserwowali Müller-Turgau i Osterwalder już w 1913 roku (wg Czalenko, 1941), stwierdzając, że sprawcami tego zjawiska były bakterie fermentacji mlekowej. Rozkładały one kwas jabłkowy zawarty w winie, wytwarzając kwas mlekowy i CO_2. Czalenko (1941) w odkwaszonych moszczach i winach wykrył drożdże rozszczepkowe, które energicznie rozkładały kwas jabłkowy. Kudriawcew (1954) nazwał je *Schizosaccharomyces acidodevoratus*. Drożdże te szybciej dokonują rozkładu kwasu jabłkowego niż bakterie; proces ten prowadzą w okresie głównej fermentacji, często w pierwszych 3 lub 4 dniach jej trwania. W odróżnieniu od bakterii drożdże te rozkładają kwas jabłkowy całkowicie — do CO_2 i H_2O. Działalność ich jest przyczyną znacznych strat w przemyśle winiarskim i dlatego wzbudziły one zainteresowanie wśród badaczy. Gnutenko i współpracownicy (1957) oraz Czalenko i Korsakowa (1959, 1960 i 1961) badali morfologiczne i fizjologiczne właściwości drożdży rozszczepkowych rozkładających kwas jabłkowy oraz określili warunki, w których zachodzi ten proces. Badania te miały na celu znalezienie skutecznego środka zapobiegania odkwaszaniu win i moszczów. Wyniki ich badań wykazały, że drożdże wyizolowane z różnych rejonów klimatycznych odznaczały się różnymi uzdolnieniami do rozkładania kwasu jabłkowego. Szczepy wyizo-

lowane z rejonów o ciepłym klimacie prowadziły proces odkwaszania energiczniej niż szczepy z rejonów północnych. SO_2 dopiero w dawkach większych od 1100 mg/l hamował działalność tych drożdży; również temperatura, w granicach do 15°, hamowała proces odkwaszania. Drożdże winiarskie wprowadzone do moszczów razem z drożdżami rozszczepkowymi w stosunku 10 : 1 hamowały przebieg procesu odkwaszania.

Założenia prac Czalenki i Gnutenki opierały się jednak na innym schemacie procesu technologicznego niż stosowany w naszym przemyśle winiarskim.

CEL PRACY

Celem pracy było zbadanie zdolności drożdży rozszczepkowych występujących w niektórych naszych zakładach winiarskich do rozkładu kwasu jabłkowego, jak też określenie warunków w jakich ten proces najintensywniej zachodzi oraz czynników, które go hamują.

Badano wpływ stężenia kwasu jabłkowego na szybkość jego rozkładu, wpływ stężenia cukru w pożywce, stężenia alkoholu oraz drożdży winiarskich wprowadzonych do środowiska fermentacyjnego z drożdżami odkwaszającymi.

METODY PRACY

Drożdże rozszczepkowe wyodrębniono z odkwaszonych moszczów i win przez posiew na pożywkę agarową, składającą się z brzeczki piwnej o gęstości 7° Blg., zakwaszonej kwasem jabłkowym i zawierającej dodatek błękitu bromotymolowego jako wskaźnika. Wokół kolonii drożdży odkwaszających pożywkę na skutek obniżenia się kwasowości powyżej *pH* 4,6 tworzyła się strefa o niebieskiej barwie. Wyizolowane drożdże hodowano również na syntetycznych pożywkach płynnych z 0,5% dodatkiem peptonu oraz kwasu jabłkowego w dawkach 0,6–1,5%. Wpływ stężenia cukru i alkoholu badano na pożywce składającej się z moszczu jabłkowego wzbogaconego dodatkiem sacharozy w ilości 15–30% oraz dodatkiem 5–15% alkoholu. Jako test działalności drożdży roszczepkowych stosowano pomiar ogólnej zawartości kwasów w 5 ml hodowli drożdży, miareczkując 0,1 n ługiem sodowym. Przed miareczkowaniem usuwano z hodowli CO_2. Wynik pomiaru kwasowości przeliczano na g kwasu jabłkowego w litrze hodowli. W mieszanych hodowlach używano drożdże winiarskie Riesling, jako słabo fermentujące, lub drożdże Sherry i Madera, jako silnie fermentujące.

WYNIKI BADAŃ

Z odkwaszonych moszczów jabłkowych i wiśniowych oraz win wyizolowano 8 szczepów drożdży rozszczepkowych, których komórki miały kształty cylindryczne lub owalne. Na podstawie cech diagnostycznych zaliczono je wg Kudriawcewa (1954) do gatunku *Schizosaccharomyces acidodevoratus*. Na pożywce stałej z dodatkiem

błękitu bromotymolowego wytwarzały one niebieską strefę wokół kolonii. Odkwaszone moszcze, z których wyizolowano szczepy, były konserwowane dodatkiem SO_2 w dawkach 640-1130 mg/l. Po dwumiesięcznym okresie przechowywania kwasowość tych moszczów obniżyła się z 15,5 g/l kwasu jabłkowego do około 1,7 g/l (około 90%). Na pożywce bez dodatku SO_2 drożdże te szybciej rozkładały kwas jabłkowy; niezależnie od jego stężenia w podłożu, odkwaszenie następowało w okresie 7-8 dni. Badane szczepy rozkładały kwas jabłkowy z jednakową intensywnością (tabela I) .

Tabela I

Wpływ kwasowości początkowej na proces odkwaszania
Influence of the initial sourness of must on the desouration process

Nr szczepu Strain No	Czas fermentacji (w dobach) Fermentation period (in days)										
	0	2	3	4	5	6	8	11	13	15	17
	Zawartość kwasu jabłkowego (gl/l) Malic acid (g per l)										
3	6,9	5,8	—	4,4	—	2,5	1,7	1,6	1,6	1,6	1,6
1	10,5	6,0	3,1	3,0	2,7	2,4	2,4	2,5	2,4	2,4	2,4
2	10,5	3,0	3,0	3,0	3,0	2,7	2,7	2,7	2,8	2,7	2,7
3	10,5	3,0	3,0	3,0	3,0	2,7	2,7	2,6	2,6	2,6	2,6
4	10,5	3,0	3,0	2,9	2,7	2,7	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
5	10,5	3,2	3,0	3,0	2,8	2,6	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
6	10,5	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	2,7	2,7	2,7	2,7	2,8
7	10,5	3,2	3,0	3,0	2,7	2,7	2,6	2,6	2,7	2,7	2,7
8	10,5	3,0	3,0	3,0	2,7	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6	2,8
kontrola	10,5				11,0			11,1			11,2
1	15,6	15,4	15,1	12,0	9,3	4,3	3,2	3,2	3,2	3,2	3,2
2	15,6	15,0	13,6	11,5	7,6	3,9	3,9	3,9	3,5	3,5	3,5
3	15,6	15,6	13,7	7,4	5,1	4,9	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
4	15,6	15,6	10,1	5,8	4,2	3,9	3,6	3,6	3,6	3,8	—
5	15,6	15,3	9,4	4,2	3,9	3,4	3,4	3,4	3,2	3,4	—
6	15,6	14,7	8,3	5,1	4,8	4,2	4,0	4,0	3,8	3,8	—
7	15,6	14,9	8,4	7,3	—	5,9	4,3	4,2	3,8	3,8	—
8	15,6	15,6	11,7	4,9	4,2	3,4	3,7	3,7	3,7	4,2	—
kontrola	15,6	15,8	—	—	16,0	16,0	—	—	—	16,1	—

Końcowa ogólna zawartość kwasów w odkwaszonej pożywce zależała od początkowego stężenia kwasu jabłkowego w pożywce, przy czym procentowa ilość rozłożonego kwasu była jednakowa i wynosiła od 75-78%.

Wpływ stężenia cukru na przebieg procesu odkwaszania badano na 4 szczepach drożdży rozszczepkowych. Stężenia cukru w granicach od 10 do 30% nie hamowały rozkładu kwasu jabłkowego. Niektóre badane stężenia cukru nawet stymulowały proces odkwaszania. Naj-

szybciej proces ten zachodził przy 20% stężeniu sacharozy; już po 3 dniach fermentacji; przy 15% stężeniu tego składnika — dopiero po 7 dniach lub nawet po 10 dniach. W pożywkach zawierających przed fermentacją od 15 do 30% cukru obserwowano ponowne zakwaszenie pożywki po fazie odkwaszania. W porównaniu do przeciętnej najniższej kwasowości pożywki w czasie fermentacji, kwasowość wzrosła o 46% przy początkowej 15% zawartości cukru, o 113% przy 25% zawartości cukru i o 156% w pożywce zawierającej 30% cukru (tab. II).

Tabela II

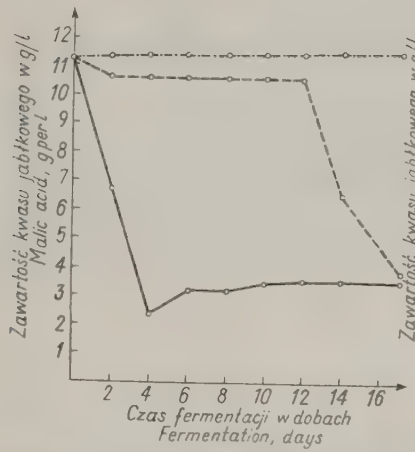
Wpływ stężenia cukru na rozkład kwasu jabłkowego przez drożdże *Schiz. acidodevoratus*

Influence of sugar concentrations on the malic acid decomposition by *Schiz. acidodevoratus*

Nr szczepu Strain No	% cukru Sugar, per cent	Czas fermentacji (w dobach) Fermentation period (in days)											
		0	3	4	5	6	7	10	12	14	16	20	24
		Zawartość kwasu jabłkowego (w g/l) Malic acid (g per l)											
1	10	10,5	3,1	3,0	2,7	2,4	2,4	2,5	2,4	2,4	2,4	—	—
3	„	„	3,0	3,0	2,7	2,7	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6	—	—
4	„	„	3,0	2,9	2,7	2,7	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	—	—
5	„	„	3,0	3,0	2,8	2,6	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	—	—
1	15	„	5,2	2,9	2,6	2,3	2,3	2,7	2,5	2,7	3,3	3,4	3,4
3	„	„	2,9	2,7	2,7	2,3	2,5	2,5	2,5	2,6	3,3	3,4	3,4
4	„	„	3,1	2,7	2,7	2,7	2,5	2,2	2,6	2,7	3,4	3,4	3,4
5	„	„	2,7	2,6	2,6	2,5	2,5	2,3	2,6	3,0	3,3	3,7	3,7
1	20	10,4	2,3	2,3	2,5	2,6	2,9	2,9	3,0	3,0	3,3		
3	„	„	2,2	2,2	2,6	2,7	3,0	3,1	3,1	3,1	3,1	—	—
4	„	„	2,1	2,2	2,6	2,6	2,9	2,9	3,0	2,9	3,3	—	—
5	„	„	2,5	2,5	2,9	3,0	3,3	3,8	3,8	3,8	3,8	—	—
1	25	10,5	3,0	2,6	2,6	2,9	2,9	3,0	3,5	3,5	4,0	6,0	6,1
3	„	„	3,3	2,7	2,7	2,7	2,9	3,3	3,7	4,0	4,0	5,2	5,2
4	„	„	3,8	2,3	2,3	2,7	2,9	3,0	3,3	3,7	4,4	5,2	5,3
5	„	„	3,5	3,0	2,7	2,6	2,9	3,1	3,1	3,7	4,4	5,5	6,0
1	35	„	9,7	5,4	2,9	2,9	2,3	2,6	3,0	3,7	4,4	6,1	6,1
3	„	„	3,9	2,7	2,3	2,6	2,6	3,0	3,7	4,2	4,8	5,9	6.0
4	„	„	6,5	2,9	2,9	2,7	2,5	3,0	3,4	3,9	4,6	5,5	5,9
5	„	„	6,1	2,9	2,9	2,6	2,6	2,9	3,4	3,9	4,4	5,5	6,5

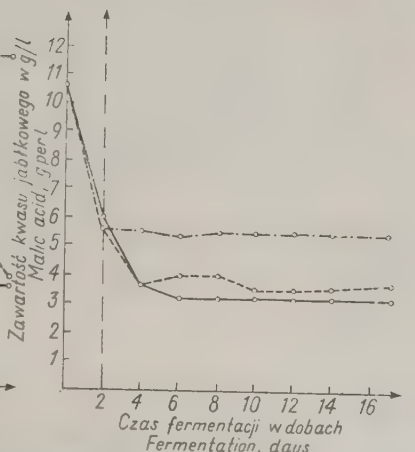
Alkohol wprowadzony do pożywki zaszczepionej drożdżami rozszczepkowymi działał na przebieg procesu odkwaszania w zależności od jego stężenia i czasokresu jego wprowadzenia do pożywki. Przy 10% stężeniu alkoholu dopiero po 12 dniach następowało odkwaszanie pożywki, natomiast 15% stężeniu alkoholu całkowicie hamowało pro-

ces odkwaszania. Alkohol w tym stężeniu wprowadzony po 2 dniach trwania fermentacji również hamował odkwaszanie pożywki, 10% stężenie tego składnika nie hamowało rozkładu kwasu jabłkowego (rys. 1 i 2).



Rys. 1. Wpływ zawartości alkoholu na przebieg procesu odkwaszania
Fig. 1. Influence of alcohol concentration on the desouration process

—— 5% alkoholu — 5 p. c. of ethanol,
- - - - - 10% alkoholu — 10 p. c. of ethanol,
—.—.— 15% alkoholu — 15 p. c. of ethanol



Rys. 2. Wpływ alkoholu wprowadzonego po 2 dniach fermentacji na przebieg procesu odkwaszania
Fig. 2. Influence of alcohol concentration introduced after 2 days of fermentation on the desouration process

Wg Gnutenki (1957) oraz Czalenki (1961) drożdże winiarskie dodane do moszczu razem z drożdżami rozszczepkowymi, w zależności od stosunku pomiędzy ilością dodanych do moszczu komórek drożdży, hamowały proces odkwaszania.

W naszych doświadczeniach, prowadzonych na moszczu wzbogaconym 25-30% dodatkami cukru, drożdże Riesling nie powstrzymały procesu odkwaszania nawet przy stosunku 20 : 1. Już po 8 dniach fermentacji obserwowano najsilniejszy spadek kwasowości fermentującego środowiska; rozkładowi uległo 60% kwasu jabłkowego. Drożdże Sherry w stosunku 20 : 1 częściowo hamowały proces rozkładu kwasu jabłkowego, lecz i w tym przypadku 43% kwasu uległo rozłożeniu. Tę niezgodność wyników uzyskanych przez nas z wynikami Gnutenki i Czalenki można wytłumaczyć tym, że badacze ci używali do doświadczeń moszcze zawierające około 10% cukru bez dalszego dosładzania sacharozą. Taka ilość cukru szybko uległa odfermentowaniu przez drożdże

Tabela III

Przebieg procesu odkwaszania w mieszanych hodowlach drożdży
The desouration process of wine fermented with wine yeasts and *Schizosaccharomyces*

Drożdże Yeasts	Stosunek ilości komórek Ratio of mixed cells	Czas fermentacji (w dobach) Fermentation period (in days)									
		0	2	4	6	8	10	12	14	17	23
		Zawartość kwasu jabłkowego (w g/l) Malic acid (g per l)									
Riesling		6,9	7,5	7,3	7,4	7,4	7,6	7,7	7.7	7,7	7,8
Sherry		6,9	7,8	7,8	8,0	8,1	8,2	8,7	8,7	8,7	8,8
Madera		6,9	7,7	7,5	7,7	7,7	7,7	7,8	7,8	7,8	7,8
Schiz. acid.		6,9	2,2	1,6	1,7	1,7	2,4	3,0	—	—	4,0
Riesling + *Schiz. acid.*	5 : 1	6,9	3,9	2,1	2,3	2,5	2,7	2,8	—	—	3,5
Sherry + *Schiz. acid.*	5 : 1	6,9	4,1	2,3	2,1	2,5	2,8	3,0	—	—	3,9
Madera + *Schiz. acid.*	5 : 1	6,9	3,5	2,3	2,1	2,7	2,8	3,0	—	—	3,7
Riesling		13,4	13,9	13,6	13,1	12,8	12,8	13,1	13,1	13,1	
Sherry		13,4	13,5	13,5	13,6	13,1	13,1	13,1	13,1	13,4	
Schiz. acid.		13,4	6,4	3,4	3,2	3,7	3,7	3,7	3,7	3,8	
Riesling + *Schiz. acid.*	10 : 1	13,4	10,2	7,0	4,9	4,2	4,2	4,3	4,4	4,5	
Sherry + *Schiz. acid.*	10 : 1	13,4	8,5	6,2	5,4	4,9	5,0	5,3	5,3	5,4	
Riesling + *Schiz. acid.*	20 : 1	13,4	8,6	4,7	4,1	3,6	3,4	3,6	3,8	4,0	
Sherry + *Schiz. acid.*	20 : 1	13,4	11,0	9,7	8,1	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	

winiarskie zanim drożdże rozszczepkowe rozmnożyły się w dostatecznej ilości. Drożdże rozszczepkowe w pożywce pozbawionej cukru nie rozkładają kwasu jabłkowego. Gnutenko wyraźnie podkreślał, że w okresie pierwszej doby trwania fermentacji drożdże rozszczepkowe rozmnażały się powoli, a w drugiej dobie ilość komórek drożdży rozszczepkowych osiągnęła ilość komórek drożdży winiarskich (w hodowlach mieszanych). W naszych doświadczeniach pożywki zawierały 25-30% cukru, dzięki czemu cukier pozostając przez dłuższy okres w pożywce stwarzał drożdżom korzystne warunki rozwoju i rozkładu kwasu jabłkowego. Takie warunki fermentacji istnieją w naszym przemyśle winiarskim i dlatego ten sposób walki z odkwaszaniem win nie może przynieść pożądanych wyników.

WNIOSKI

1. Wszystkie badane szczepy drożdży rozszczepkowych, zaliczone do gatunku *Schizosaccharomyces acidodevoratus*, odznaczały się podobnymi zdolnościami rozkładu kwasu jabłkowego. Droższe rozkładały 75-80% kwasu. 2. Stężenia kwasu jabłkowego w granicach 6-15 g l nie wpływały na jego rozkład. 3. Cukier w stężeniach do 30% nie hamował procesu odkwaszania. Proces ten zachodził najszybciej przy 20% stężeniu cukru w pożywce. 4. Przy wyższych stężeniach cukru kwasowość pożywki wzrastała w końcowym okresie fermentacji na skutek wtórnego jej zakwaszania przez drożdże rozszczepkowe. 5. Alkohol w stężeniach do 10% nie hamował procesu odkwaszania. 6. Drożdże winiarskie silnie fermentujące, wprowadzone do moszczów razem z rozszczepkowymi w stosunku 20 : 1, tylko częściowo hamowały proces rozkładu kwasu jabłkowego. Drożdże winiarskie o słabych uzdolnieniach fermentacyjnych nie wywierały wpływu na przebieg procesu odkwaszania wina.

Literatura

Czalenko, D. K., 1941: Pricziny poniżenija kisłotnosti pri brożenii płodowych win. *Trudy centr. nauczno-issledow. enochimiczeskoj łaborat.*, **1**: 92.

Czalenko, D. K., Korsakowa, T. F., 1959: O biołogiczeskom poniżenii kisłotnosti w jabłocznych sokach i sidrie. *Winodielije i winograd.*, **7**: 21.

Czalenko, D. K., Korsakowa, T. F., 1961: Ustranienije biołogiczeskogo kisłotoponiżenija w jabłocznych sokach wyzywajemogo *Schizosaccharomyces acidodevoratus*. *Mikrobiołogija*, **30**: 1952.

Czalenko, D. K., Korsakowa, T. F., 1960: Wozbuditieli biołogiczeskogo poniżenija kisłotnosti w jabłocznych sokach i sidrie. *Mikrobiołogija*, 29: 587.

Gnutienko, M. P., Popkowa, L. A., Nadieżko, Z. A., Diemczuk, A. I., Jegorowa, S. I., 1957: Pigmientoobrazujuszczije *Schizosaccharomyces acidodevoratus* i miery borby z nimi. *Mikrobiołogija*, **26**: 353.

Kudrjawcew, W. J., 1954: Sistiematika drożżej. Izd. AN SSSR, Moskwa.

Stanisław Bujak and *Wiesław Dąbkowski*

DECOMPOSITION OF MALIC ACID BY *SCHIZOSACCHAROMYCES ACIDODEVORATUS* UNDER DIFFERENT FERMENTATION CONDITIONS

Summary

The purpose of this work was to investigate the malic acid decomposition by *Schizosaccharomyces* isolated from desoured apple and cherry musts. The influence of different sugar, ethyl alcohol and malic acid concentrations on the malic acid decomposition was studied as well as the influence of mixed cultures of wine yeasts and *Schizosaccharomyces*.

It was found that the concentration of 6 to 15 g per litre of malic acid had no influence on the desouration process. *Schizosaccharomyces* were able

to decompose 75-80% of malic acid. A concentration of 15% of alcohol inhibited this process completely, regardless the period of the alcohol introduction. Sugar in a concentration of 10-30% had no effect on desouration. A 20% concentration of sugar stimulated the decomposition of acid. Wine yeasts in mixed cultures with *Schizosaccharomyces* inhibited this process partly, depending on their fermenting abilities and ratios between the numbers of cells.

Adres autorów:
Authors' address:

Doc. dr S. Bujak
Zakład Technologii Rolnej, WSR,
Lublin, ul. Kr. Leszczyńskiego 9

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1961, **10**, 417-422

Anna Luchterowa, Elżbieta Dutkiewiczowa, and *Anna Czapikówna*

INVESTIGATIONS ON MICROORGANISMS IN TRICKLING FILTERS

From the Nature Conservation Institute, Polish Academy of Sciences, Kraków, and Department of Microbiology, High School of Economics, Kraków

Received December 1 1960

Summary

This paper contains the description of an active film development and its microbiological composition in trickling filters, fed with an artificial phenol sewage.

The investigations were conducted on the distribution and development of microorganisms in trickling filters, in laboratory conditions. Tap water with a mineral medium and phenol as the sole source of carbon was passed through the filters.

METHODES

Description of the device for cleaning the trickling filters. The trickling filters used for investigations consisted of glass tubes 1 m high and 6 cm diameter. They were filled up with slag grains of 10 mm diameter. Tap water at a temperature of 20°C with an addition of 100 mg/l phenol and a basic mineral medium (KNO_3 — 1.0 g, $MgSO_4$ — 0.2 g, K_2HPO_4 — 0.5 g, NaCl — 0.5 g, tap water — 1000 ml) was passed through three filters (*A*), (*B*) and (*C*) in identical conditions at temperature ca 18°C.

A detailed description of the device was given in a previous publication (Luchter *et al.*, 1960).

During the period from the setting up to the dismantling of the filters acidity and phenol content of influent and effluent were determined daily. Acidity was determined colorimetrically, phenol content was determined colorimetrically using p-nitroaniline. Immediately before dismantling filter *B* the contents of oxygen and some mineral compounds in influent and effluent was assayed and BOD_5 was measured. Generally accepted methods were used (Just, Hermanowicz, 1955).

Microbiological analysis of the filters. Microbiological investigations were carried out after dismantling the filters (*A*), (*B*), and (*C*) after 3, 11 and 18 months activity, respectively.

After removing the contents, each filter was divided into 5 horizontal layers: 100 mg of the biological film taken off the slag was transfered into

10 ml of sterile distilled water and shaken for 15 minutes to obtain a homogenous suspension.

The fermentation of sugars was investigated in a basic liquid mineral medium with 3 per cent of glucose or lactose. After 24 and 48 hours the acidity of the medium and the amount of gas produced were determined. Aerobic decomposition of cellulose was investigated on mineral agar medium covered with a disc of filter paper. After 7, 9 and 11 days macroscopic examination of microorganisms was carried out.

Phenol decomposition was assayed in the basic mineral medium with 100 mg of phenol as the sole source of carbon. The turbidity of the medium and the decrease of the phenol content were measured. The ability to utilize hydrocarbons were carried out in mineral agar medium in exsiccators in an atmosphere of petrol vapour.

The microfauna in individual sections of the filters was determined by microscopic examination.

RESULTS

Chemical analysis of effluent. During the experiments the acidity of influent remained at *pH* 7,0, phenol content was about 100 mg/l, the highest concentration being 190 mg/l.

The reaction of effluent varied between *pH* 7,0-7,2 and the phenol content, depending on the amount of phenol in the medium and the duration or the filtering period, between 0 and 40 mg l (Graph 1).

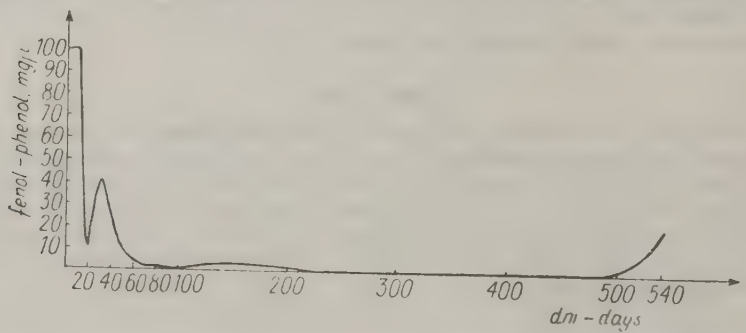


Fig. 1. Changes in phenol concentration in effluent from trickling filters
Rys. 1. Zmiany zawartości fenolu w wodzie wypływającej z filtrów

The results of the chemical analysis of influent medium and effluent carried out immediately before dismantling of the filter (*B*), are shown in Table I.

At the end of 11 months working period of the filter decrease of the total nitrogen and nitrates and an increase of ammonia and organic nitrogen was observed. The decrease of phosphates and increase of sulphates content is worth of consideration. There was considerable decrease of BOD_5 and oxidizability.

Table I

Chemical analysis, (mg per 1) Filter (*B*)
Analiza chemiczna (mg/l) — Filtr (*B*)

Analysis of water mg per l	Influent	Effluent
N/NH_3	0.02	0.16
N/NO_2	0.001	0.076
N/NO_3	20.0	11.0
N org	0.72	2.84
N total	20.741	14.076
SO_4^-	47.3	59.2
PO_4	80.8	44.0
Oxygen absorbed from permanganate (O_2)	320	9.6
BOD_5	147.0	13.9

Microbiological analysis of the filter. Bacteria isolated from filters fermented glucose and lactose with production of acid and gas. Growth of bacteria in petrol vapour atmosphere was observed after 5 days. This result was independent on the period of filters activity. Phenol was decomposed after 24 hours. The highest rate of phenol decomposition was shown by bacteria isolated from the outer sections of the filter. It was found that bacteria isolated from filters (*A*) and (*B*) decomposed phenol more actively than those from filter (*C*).

The cellulolytic bacteria were found in the biological film of all filters: in the filter (*A*) only in the outer sections, in the filter (*B*) in inner parts, and in the filter (*C*) in all sections.

Nitrate reducing bacteria were isolated from all sections of the filters. In the cultures of bacteria from the outer sections of the filters the complete reduction of nitrates was observed already after 72 hours of incubation. No sign of denitrification was found in anaerobic conditions. The bacteria isolated were not able to liquefy the gelatine in stab cultures.

The ammonification of asparagine by isolated bacteria assayed by the ammonia liberation was observed after 72 or 96 hours of incubation.

Microfauna. Protozoa were the most numerous in the filter (*A*) (*Amoeba limax* Dujardin, *Chilodonella uncinata* (Ehrbg) and *Cyclidium lanuginosum* (Penard)). Small number of *Nematodes* and

single specimens of *Rotatoria* (*Lecane inermis* (Bryce) and *Adineta vaga* (Davis)) vere also found.

In the filter (*B*) protozoa disappeared almost completely. On the other hand there appeared more *Rotatoria* and *Nematoda*. Beside the species of *Rotatoria* found on filter (*A*), *Habrotrocha ligula* (Bryce) and *Rotaria rotatoria* (Pallas) were also found. Nematodes were the most numerous, and appeared in all strata of the filter.

Filter (*C*) investigated after 10 months activity was poorest in the microfauna, both quantitatively and qualitatively. Relatively the most numerous were *Nematoda* (about 15 individuals per glass). Only single individuals of *Rotatoria* (*Lecane pyriformis* (Daday) and *Adineta*

Table II

Microfauna on trickling filters
Drobnoustroje złóż zraszanych

Filter	*Nematodes*	*Rotatoria*	*Ciliata*	*Rhizopoda*
A	+++	*Lecane inermis* (Bryce) + *Adineta vaga* (Davis) +	*Uronema marinum* (Duj) +++ *Chilodonella uncinata* (Ehrbg) +++ *Cyclidium lanuginosum* (Penard) +++	*Amoeba limax* (Dujardin)+++
B	++++	*Habrotrocha ligula* (Bryce)++ *Adineta vaga* (Davis)+++ *Rotaria rotatoria* (Pallas)++ *Lecane inermis* (Bryce)+++	*Cyclidium sp.* +	—
C	++	*Lecane pyriformis* (Daday)+ *Adineta vaga* (Davis)+	*Chilodonella uncinata* (Ehrbg)++ *Rhopalophrya pilosa* (Penard)++	—

absent	—	brak
single	+	okazy pojedyncze
scanty	++	okazy nieliczne
numerous	+++	okazy liczne
very numerous	++++	wielka ilość okazów

vaga (Davis) were found. There were also very few *Infusoria* (*Chilodonela uncinata* (Ehrbg) and *Rhopalophrya pilosa* (Penard)).

Investigations on algae in filters (*B*), (*C*) were conducted by Janicka (1961). Untill 17th months of observation only few algal cells could be found by microscopic examination (*Nitschia oblonga* and *Navicula minima*).

Later green streaks appeared in the upper part of filter (*C*) and then in the lower part, on the lighted side. It contained many forms of *Volvocales, Cyanaphyceae,* and *Bacillariophyta.*

DISCUSSION

It was shown that allready after the first month there was abundant microflora, able to use phenol as a sole source of carbon, and causing the marked decrease in phenol content of effluent. The biological active film was composed of different types of bacteria, among which nitrate reducing, ammonifying, and cellulolytic bacteria were identified.

The most biologically active bacterial groups were found in the outer sections of the filters.

It was observed that intensity of phenol decomposition and denitrification diminished after some period of filters activity.

It seems that under the influence of bacteria decomposing phenol, its concentration was diminished to such an extent that gradually other bacteria, and later *Protozoa* and *Algae* could develope abundantly, forming a typical active film on slag grains in trickling filters.

LITERATURE

Janicka, Z., 1961: Glony występujące na filtrach zraszanych. (Maszynopis unpublished).

Just, J., Hermanowicz, 1955: Fizyczne i chemiczne badania wody do picia i potrzeb gospodarczych. Warszawa.

Luchterowa, A., Dutkiewiczowa, E., Czapikówna, A., 1960: Z badań nad mikroorganizmami złoża zraszanego. *Gaz, Woda, i Tech. San.* nr 9 Warszawa.

Anna Luchterowa, Elżbieta Dutkiewiczowa i *Anna Czapikówna*

BADANIA NAD DROBNOUSTROJAMI ZŁÓŻ ZRASZANYCH

Streszczenie

Przeprowadzono badania nad występowaniem mikroorganizmów w błonie biologicznej ziarn żużlowych trzech filtrów po różnym czasie ich działania (3. 11 i 18 miesięcy) pod wpływem „ścieku" fenolowego. Najwcześniej, gdyż już w pierwszym miesiącu działania filtru, można było stwierdzić w rozwijającej się błonce biologicznej występowanie bakterii rozkładających fenol. Po

3 miesiącach działania złoża zraszanego wykazano obok bakterii rozkładających fenol występowanie bakterii denitryfikacyjnych, amonofikacyjnych, błonnikowych oraz rozkładających węglowodory i węglowodany. Badania przeprowadzone po 11 miesiącach działalności tego biologicznego złoża potwierdziły powyższe wyniki. Po 18 miesiącach stwierdzono zmniejszenie aktywności bakterii rozkładających fenol i denitryfikacyjnych, wzrosła zaś aktywność bakterii błonnikowych.

Badania mikrofauny wykazały na filtrze po 3 miesiącach działania występowanie wymoczków i ameb oraz nielicznych tkankowców. Filtr po 11 miesiącach charakteryzował się zwiększeniem ilości tkankowców oraz spadkiem ilości wymoczków i brakiem ameb. Na złożu 18-miesięcznym nastąpiło zmniejszenie ilości tkankowców i niewielki wzrost ilości wymoczków przy braku ameb.

Na podstawie wyników pracy można stwierdzić, że najwcześniej rozwijające się bakterie fenolowe stwarzają odpowiednie środowisko dla rozwoju innych drobnoustrojów.

Adres autora:
Authors' address:

Prof. dr A. Luchter,
Kraków, ul. Kazimierza Wielkiego 89/8

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1961, 10 : 423—478

BADANIA TERENÓW NAWADNIANYCH ŚCIEKAMI POD WZGLĘDEM HIGIENICZNO-SANITARNYM [WSTĘP]

AREA IRRIGATED WITH SEWAGE. ITS HYGIENIC AND SANITARY EVALUATION [INTRODUCTION]

Prace nad tym zagadnieniem, subsydiowane przez Wydziały II i V Polskiej Akademii Nauk oraz częściowo przez Wyższą Szkołę Rolniczą i Instytut Melioracji i Użytków Zielonych we Wrocławiu, wykonane zostały przez zespół: prof. dra J. Wierzbickiego (IMUZ we Wrocławiu), doc. dr N. Balicką (Zakład Mikrobiologii Rolnej WSR, Wrocław), doc. dra S. Chudobę (Zakład Zoologii WSR, Wrocław), prof. dra H. Makowera (Zakład Wirusologii Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu), prof. dra L. Ogielskiego (Zakład Higieny Produktów Zwierzęcego Pochodzenia WSR, Wrocław), prof. dra G. Poluszyńskiego (Zakład Parazytologii WSR, Wrocław), prof. dra A. Skurskiego (Zakład Mikrobiologii Weterynaryjnej WSR, Wrocław), prof. dra S. Ślopka (Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu), prof. dra T. Sobiecha (Zakład Chorób Zakaźnych Wydziału Weterynaryjnego WSR, Wrocław), dra L. Ugorskiego (WZHW, Wrocław) i prof. dra J. Zwierza (Zakład Badań nad Leptospirozą Instytutu Weterynarii, Wrocław).

Kierownictwo nad zespołowymi badaniami sprawowali profesorowie: J. Zwierz, G. Poluszyński, J. Wierzbicki i L. Ogielski.

Wykorzystanie ścieków do nawadniania użytków rolnych jest problemem olbrzymiej wagi. Problem ten nie może jednak być rozwiązany bez uprzedniego zbadania skutków sanitarno-epidemiologicznych takiego zabiegu. Osiem zamieszczonych poniżej publikacji stanowi częściowy wynik badań, przeprowadzonych nad powyższym zagadnieniem przez wspomniany zespół badawczy.

Józef Zwierz

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1961, 10 : 425 - 428

Jan Wierzbicki

BADANIA TERENÓW NAWADNIANYCH WODAMI ŚCIEKOWYMI POD WZGLĘDEM HIGIENICZNO-SANITARNYM. I. ZNACZENIE WYKORZYSTANIA ŚCIEKÓW DO NAWADNIANIA UŻYTKÓW ROLNYCH I LEŚNYCH

AREA IRRIGATED WITH SEWAGE. ITS HYGIENIC AND SANITARY EVALUATION. I. THE ROLE OF IRRIGATION WITH SEWAGE IN AGRICULTURE AND FORESTRY

Z Instytutu Melioracji i Użytków Zielonych we Wrocławiu

Wpłynęło 15 maja 1961 r.

W związku z szybkim wzrostem ilości ścieków zwiększa się niepomiernie zanieczyszczenie wód powierzchniowych, a w licznych przypadkach również wód gruntowych. Na przykład wg badań K. Stangenberg zanieczyszczenie Odry we Wrocławiu w okresie 1948-1957 wzrosło czterokrotnie.

Ścieki muszą być oczyszczane, przy czym stopień oczyszczania powinien gwarantować pełną przydatność odbiorników ścieków, tj. wód powierzchniowych (potoków, rzek i jezior) dla powszechnego użytkowania oraz dla rozwoju ryb. Wymagania obowiązującego w Polsce rozporządzenia Ministra Gospodarki Komunalnej (z dnia 2 IX 1950 r., Dz.U.R.P., Nr 41, poz. 371) są surowe; przestrzeganie tych wymagań przez prezydia miejskich i gminnych rad narodowych oraz przez zarządy fabryk zapewniłoby bezwarunkowo należyty stan naszych wód powierzchniowych. Pomimo następnego zarządzenia władz (uchwała Nr 668/55 Prezydium Rządu z dnia 20 VIII 1955), zaostrzającego kary za beztroskie zanieczyszczanie wód powierzchniowych, przeważająca ilość ścieków jest w praktyce bądź w ogóle nie oczyszczana, bądź też stopień oczyszczania jest niedostateczny. Taki stan nie jest bynajmniej charakterystyczny tylko dla naszego kraju. We wszystkich państwach uprzemysłowionych i o znacznym zagęszczeniu ludności zanieczyszczenie ściekami wód powierzchniowych jest duże i na ogół zwiększa się z roku na rok.

Ścieki są oczyszczane bądź za pomocą sposobów naturalnych, bądź sztucznych. W warunkach naturalnych środowiskiem biologicznego oczyszczania ścieków, tj. przy pomocy mikroorganizmów, jest gleba.

która jednak musi być dostatecznie przewiewna i możliwie ocieniona. W warunkach sztucznych, imitujących zazwyczaj warunki naturalne, czyli porowate środowisko przewiewne lub wodne, ścieki są oczyszczane bądź w środowisku wodnym (metoda osadu czynnego), bądź na złożach przewietrzanych; stopień oczyszczania jest przy tym na ogół gorszy niż w środowisku naturalnym.

Przy często występującym obecnie falowym odpływie ścieków trujących oczyszczanie ich w środowisku naturalnym, dzięki stosowaniu niskiego obciążenia oraz buforowym właściwościom gleby, ulega pogorszeniu tylko w nieznacznym stopniu.

Zarówno wysoki stopień oczyszczania wód ściekowych, jak też możliwość oczyszczania wód zawierających okresowo znaczną domieszkę składników trujących, stanowią zasadniczą zaletę oczyszczania ścieków w środowisku naturalnym w porównaniu ze stosowaniem do oczyszczania sztucznych metod biologicznych.

Dalszą zaletą oczyszczania wód ściekowych w glebie użytków rolnych, leśnych lub w stawach rybnych, być może zaletą jeszcze większej doniosłości, jest możność wykorzystania składników pokarmowych zawartych w tych wodach. I tak na przykład 1000 m^3 ścieków miejskich zawiera przeciętnie: 80 kg azotu ogólnego, 60 kg potasu — jako K_2O, oraz 20 kg fosforu — jako P_2O_5. Biorąc pod uwagę, że spodziewany w latach 1974-1975 odpływ miejskich i przemysłowych wód ściekowych wyniesie 6 mld m^3, i że tylko połowa tych wód może być wykorzystana, otrzymamy, odliczając 10-procentowe straty w azocie ogólnym i potasie oraz 20-procentowe w fosforze przy oczyszczaniu wstępnym, roczną zawartość czystych składników: 240 000 ton azotu ogólnego, 18 000 ton K_2O, 60 000 P_2O_5. Po przeliczeniu tych składników na sztuczne nawozy mineralne (20,5% azotniak, 40% sól potasową oraz 18% superfosfat) otrzymamy w ściekach równowartość 1 700 000 ton 20,5% azotniaku, 450 000 ton 40% soli potasowej, 333 000 ton 18% superfosfatu.

Przy uwzględnieniu obecnych cen za 100 kg sztucznych nawozów mineralnych ogólna teoretyczna równowartość składników pokarmowych zawartych w 3 miliardach m^3 ścieków wyrazi się sumą: 3,06 mld zł za azotniak, 0,48 mld zł za sól potasową, 0,32 mld zł za superfosfat. Razem: 3,86 miliardów zł rocznie.

Jak zaznaczono wyżej jest to wartość teoretyczna. Wartość rzeczywista, inaczej melioracyjna, może być wyższa, należy bowiem uwzględnić dodatkowo: 1. wartość zwilżającą ścieków, 2. wartość próchniczą, tj. korzyści uzyskane przez wzbogacenie gleby w próchnicę przy użytkowaniu ścieków, 3. wartość cieplną ścieków (na przykład jesienią, zimą i wiosną, gdy temperatura ścieków wynosi od +7° do +10°,

może być ona celowo wykorzystana dla przyspieszenia zbioru roślin nawadnianych), 4. wreszcie — wartość stymulującą, tzn. pobudzającą wzrost roślin.

Z drugiej strony, ponieważ wody ściekowe muszą być odbierane w ciągu całego roku, wykorzystanie ich często jest związane ze stratami, zwłaszcza w okresie zimy i podczas słot.

Wartość melioracyjna ścieków zależy od rodzaju gleby, na której ścieki są wykorzystywane oraz od sposobu i racjonalności ich wykorzystania. Na przykład na gruntach lekkich wartość ta może być nawet większa od wartości teoretycznej.

Przy założeniu, że przeciętna wysokość rocznych dawek nawadniających, przy nawadnianiu grawitacyjnym, wyniesie 600 mm, objętość ścieków 3 mld m^3 wystarczy do nawodnienia 500 000 ha (2,5% powierzchni użytków rolnych w Polsce), a przy nawodnieniu deszczowniany, przy rocznej dawce przeciętnej 250 mm — 1 200 000 ha (5,9% powierzchni użytków rolnych). W porównaniu z obecnie nawadnianą ściekami lub przystosowaną do nawadniania powierzchnią, wynoszącą na początku 1961 roku około 11 000 ha, zwiększenie powierzchni byłoby 45- lub 109-krotne.

Przy rolniczym użytkowaniu ścieków stosunkowo duże i oczywiste korzyści zapewnia nawadnianie łąk i pastwisk. Zwiększenie wartości karmowej plonów z tych użytków wyraża iloczyn: ilość × jakość. Wartość tego iloczynu na podstawie danych uzyskanych w ostatnich latach w dolinie Neru, gdzie nawadnia się około 3 800 ha łąk, wynosi przeciętnie $4,5 \times 2,8 \approx 13$. Opierając się na założonej powierzchni 500 000 ha nawadnianych użytków rolnych i przyjmując, że ca 65% ha powierzchni nawadnianej (325 000 ha) stanowić będą łąki i pastwiska a przy tym uogólniając wzrost wartości karmowej na nawadnianych ściekami łąkach w dolinie Neru dla całego kraju, stwierdzamy, że rolnicze wykorzystanie ścieków w podanym zakresie może powiększyć wartość karmową łąk i pastwisk w skali ogólnokrajowej o około 100%.

Ścieki z dużą korzyścią mogą być użyte do nawadniania upraw leśnych. Nawadnianie różnych odmian topoli zapewnia uzyskanie szczególnie dużych rocznych przyrostów drewna (około 25 m^3 na 1 ha w ciągu roku).

Słuszne jest twierdzenie wielu autorów, m. in. B. Botuka, że ścieki są wartościowym surowcem, którego cenne dla rolnictwa składniki powinny być celowo wykorzystane, a nie odprowadzane bezpożytecznie do morza. Pomimo tak zdawałoby się słusznych argumentów, przemawiających za jak najpowszechniejszym rolniczym i leśnym wykorzystaniem ścieków miejskich i przemysłowych, wykorzystanie to natrafia na liczne opory a nawet sprzeciwy. Przeciwnicy uzasadniają swoje sta-

nowisko niedostatecznym zabezpieczeniem stanu sanitarnego przy rolniczym wykorzystaniu ścieków.

W licznych państwach przeprowadzono prace badawcze nad warunkami sanitarno-higienicznymi przy rolniczym wykorzystaniu ścieków. Prace te zostały przeprowadzone między innymi przez dra med. L. Poppa (Brunszwik), dra wet. A. Kösera (również w NRF), dra wet. Schrötera z Haldensleben (NRD) oraz dra E. Schaffera przy udziale Państwowego Instytutu Higieny (Berlin, NRD). Prace tych badaczy wykazały, że przy racjonalnym wykorzystaniu ścieków zabezpieczenie stanu sanitarnego jest praktycznie całkowite: zwierzęta karmione trawą lub sianem z pastwisk i łąk nawadnianych ściekami są zdrowe i dobrze się rozwijają. Ilość przypadków chorobowych jest na ogół mniejsza niż z użytków obok położonych i nie nawadnianych ściekami. Charakterystyczne jest np. to, że w odniesieniu do berlińskich pól irygowanych, obejmujących w okresie międzywojennym 25 255 ha gruntów nawadnianych i nie nawadnianych, wydano w 1908 r. zarządzenie (w celu zabezpieczenia zwierząt przed chorobami zawleczonymi z zewnątrz, m. in. przed pryszczycą, gruźlicą, pomorem świń), zabraniające poszczególnym gospodarstwom nabywania zwierząt spoza pól irygowanych.

Zapoczątkowane w 1954 roku prace badawcze w Osobowicach pod Wrocławiem w oborze doświadczalnej, liczącej 100 sztuk młodych krów wypasanych na pastwiskach nawadnianych ściekami miejskimi, wykazały w następnych latach pełną zdrowotność tych krów; w szczególności wypasane bydło wolne było od gruźlicy, pryszczycy i brucellozy.

W 1957 roku we Wrocławiu został utworzony zespół złożony z 12 katedr, zakładów i instytutów, biorących udział w pracach mających na celu stwierdzenie rodzaju zakażeń zwierząt na terenach nawadnianych ściekami, prawdopodobieństwa tych zakażeń oraz sposobu zabezpieczenia przed nimi. Prace tego zespołu wyróżniają się korzystnie swoją wszechstronnością.

W celu stwierdzenia przeciętnego i maksymalnego stopnia zakażenia użytków rolnych nawadnianych ściekami w latach o różnym przebiegu pogody prace badawcze muszą być prowadzone przez dłuższy okres czasu. Zebranie wieloletnich danych statystycznych wykaże jakie choroby mogą być groźne. Równocześnie zostaną opracowane wskazania jak należy prowadzić nawadniania ściekami, aby stan sanitarny był zabezpieczony.

Adres autora:
Author's address:
Prof. dr Jan Wierzbicki,
Instytut Melioracji i Użytków Zielonych, Wrocław

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1961, 10, 429 - 432

Stanisław Fertig

BADANIA TERENÓW NAWADNIANYCH ŚCIEKAMI POD WZGLĘDEM HIGIENICZNO-SANITARNYM. II. BADANIE GRYZONI POCHODZĄCYCH Z PÓL NAWADNIANYCH WODAMI ŚCIEKOWYMI W KIERUNKU OBECNOŚCI PRĄTKÓW GRUŹLICY

Z Katedry Mikrobiologii Wydziału Weterynaryjnego
Wyższej Szkoły Rolniczej we Wrocławiu

Wpłynęło dnia 10 maja 1961 r.

Streszczenie

Zbadano na obecność prątków gruźlicy 125 małych ssaków odłowionych na pastwiskach nawadnianych ściekami. W jednym tylko wypadku udało się wyhodować szczep prątków, który określono jako typ ptasi.

W piśmiennictwie światowym nie zanotowano dotąd przypadków spontanicznego występowania gruźlicy u gryzoni polnych wywołanej prątkami ssaków i ptaków, natomiast znane są przypadki naturalnego zakażenia tych zwierząt prątkiem gruźlicy gryzoni — *Myc. tuberculosis var. muris* Brooke. Przy wprowadzaniu podskórnym prątków typu bydlęcego małe gryzonie okazały się w przybliżeniu prawie tak wrażliwe jak świnki morskie, natomiast były oporne na prątki typu ludzkiego i w jeszcze większym stopniu na prątki ptasie (Francis, 1958. Davies, 1955). W oparciu o te dane nie należało przypuszczać, aby gryzonie żyjące na polach nawadnianych wodami ściekowymi stanowić miały poważniejsze niebezpieczeństwo w ewentualnym rozprzestrzenianiu gruźlicy. Niemniej jednak jest możliwość mechanicznego przenoszenia prątków przez gryzonie, które stanowić mogą rezerwuar i potencjalne niebezpieczeństwo zakażenia zwierząt wrażliwych, a nawet ludzi. Wprawdzie eksperymenty przeprowadzone przez Schellnera (1959) zdają się wskazywać na niewielkie niebezpieczeństwo zakażenia się bydła prątkami na pastwiskach przy nawadnianiu prawidłowo oczyszczonymi ściekami (nie przedstawiają one niebezpieczeństwa zakażenia już po 14 dniach), to jednak wcześniejsze badania tego autora

wykazały, że źródło zakażeń na pastwiskach przez wiele tygodni stanowią wydzieliny i wydaliny chorych zwierząt.

Niniejsza praca wykonana została w ramach zespołu badawczego do badań ścieków i fauny terenów nawadnianych wodami ściekowymi.

Równolegle z badaniami mającymi na celu wykrywanie żywych prątków gruźlicy w wodach ściekowych, poddano badaniu na prątki gruźlicy 125 małych ssaków pochodzących z pastwisk nawadnianych ściekami miasta Wrocławia. Prócz tego zbadano 25 gryzoni nie pochodzących z tych terenów (*Mus musculus* L. — mysz domowa). Spośród 125 zwierząt odłowionych na pastwisku 123 sztuki należały do gatunku *Microtus arvalis* P a l l. — nornik zwyczajny. Ponadto zbadano z wynikiem negatywnym dwa osobniki z gatunku *Sorex araneus* L. — ryjówka aksamitna. Zwierzęta odławiano w okresie jesiennym (od września do grudnia) oraz letnim (czerwiec, lipiec), a kontrolne w styczniu i lutym.

METODY

Do badań pobierano narządy wewnętrzne (wątroba, śledziona, płuca) oraz krew z serca. Materiał rozcierano w moździerzach Weigla. Przy homogenizacji używano w początkowym okresie doświadczeń ługu sodowego, następnie fosforanu trójsodowego, a w dalszych badaniach kwasu solnego. Opracowany materiał wysiewano równolegle na pożywki płynne Sautona i jajową wg własnej modyfikacji (F e r t i g, 1960) oraz stałą pożywkę Löwensteina-Jensena. W późniejszych seriach badań pożywkę Sautona zastąpiono płynną pożywką Śuli. Pozostałym po wysiewach materiałem szczepiono świnki morskie podskórnie w okolicę prawego węzła pachwinowego używając dwóch zwierząt na każdą próbę badanego materiału. Pożywki pozostawiano w termostacie przez okres 2-3 miesięcy, zwierzęta zaś znajdowały się pod obserwacją w ciągu 3 miesięcy. Po upływie tego okresu poddawano zwierzęta powtórnej tuberkulinizacji.

WYNIKI

Wysiewy ze 150 zwierząt dały tylko w jednym przypadku wynik dodatni. Wzrost prątków uzyskano na płynnej pożywce jajowej z narządów nornika zwyczajnego, odłowionego na pastwisku nawadnianym ściekami. Należy nadmienić, że zaszczepione tym samym materiałem świnki morskie nie padły, a wykonana po ich uśpieniu sekcja dała wynik negatywny. Przesiewy otrzymanego szczepu, oznaczonego nrem *9/11*, na płynie pożywki Śuli i żółtkową oraz stałą pożywkę Löwensteina charakteryzowały się krótkim okresem wyrastania, a właściwości morfologiczne kolonii na tej ostatniej pożywce wykazały cechy odpowiadające ptasiemu typowi prątków. Na bulionie glicerolowym badany szczep rósł dając ziarnisty osad oraz nieznaczne zmętnienie. Obserwowano również wzrost szczepu na podłożu Löwensteina-Jensena w temperaturze 43°. Wysiew na podłoże solaktynowe Wagenera i Mitscherlicha dał wzrost do dwóch tygodni, wykazując typową budowę

pojedynczych kolonii. Próbę biologiczną wykonano na kurach, królikach i świnkach morskich. Dwie z tych ostatnich zaszczepiono podskórnie w okolicę węzła pachwinowego ilością 0,1 mg prątków. Jedna ze świnek padła w 16 tygodni po infekcji, wykazując zmiany gruźlicze w narządach wewnętrznych, drugą zaś uśpiono po 6 miesiącach, znajdując jedynie zmiany w miejscu szczepienia i w regionalnych węzłach chłonnych. Dwie inne świnki, zaszczepione podskórnie 0,05 mg prątków, uśpiono po 10 tygodniach. Zmiany znaleziono jedynie w miejscu wprowadzenia prątków. Dwa króliki, zakażone podskórnie 0,4 mg prątków, uśpiono po 12 tygodniach, znajdując zmiany jedynie w miejscu szczepienia. Z 4 kur 2 zaszczepiono dożylnie po 0,001 mg, a dwom pozostałym wprowadzono po 10 mg prątków domięśniowo. Kury zaszczepione dożylnie padły w 31 i 35 dniu, natomiast z zaszczepionych domięśniowo jedna padła po 4, a druga po 7 tygodniach od chwili zakażenia.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Wyizolowany szczep prątków mimo pewnych odchyleń w próbie biologicznej (narządowa gruźlica u jednej ze szczepionych świnek morskich) określono jako typ ptasi. Stwierdzenie dość znacznej zjadliwości świeżo izolowanych prątków gruźlicy typu ptasiego w stosunku do świnek morskich nie jest przypadkiem odosobnionym. Tego rodzaju fakt stwierdziła Meissner (1960).

Obecność prątków gruźlicy typu ptasiego w środowisku, w którym przebywa bydło, stwarza możliwość jego zakażenia i zachorowania. W piśmiennictwie opisano tego rodzaju zakażenia wywołane typem ptasim prątków (Raška, 1959), które prowadziły do zapaleń wymienia macicy i poronień. Inni autorzy (Juskowiec i Tuzowa, 1960), stwierdzając zachorowalność bydła na gruźlicę wywołaną prątkami ptasimi, nie znajdowali w narządach specyficznych zmian gruźliczych typowych dla prątków bydlęcych. Ostatnio pojawia się też coraz więcej prac wskazujących na występowanie niespecyficznej odczynowości tuberkulinowej wywołanej prątkami typu ptasiego (Raška, 1959; Juskowiec i Tuzowa, 1960; Stryszak, 1960).

Fakt uzyskania jednego tylko dodatniego wyniku na 125 badanych małych ssaków pochodzących z pól nawadnianych ściekami wskazuje na niewielką możliwość przenoszenia prątków gruźlicy przez te zwierzęta, tym bardziej, że wyizolowany szczep typu ptasiego nie wywołał widocznych zmian w organizmie gryzonia.

Faktu obecności prątków gruźlicy typu ptasiego nie można z całą pewnością wiązać z nawadnianiem pól wodami ściekowymi.

Wydaje się więc, że prawdopodobieństwo zakażenia bydła przez gryzonie żyjące na pastwiskach nawadnianych ściekami praktycznie jest bez znaczenia.

LITERATURA

Davies, G. O., 1955: Veterinary Pathology and Bacteriology. London.

Fertig, S., 1960: Formy wzrostowe prątków na żółtku jaja kurzego. *Arch. Immunol. Terap. Dośw.*, **8**: 77.

Francis, 1958: Tuberculosis in Animals and Man. A Study in Comparative Pathology, Cassell a. C. Lim, London.

Juskowiec, M. K., Tuzowa, R. W., 1960: Zarażajemost krupnogo rogatogo skota tubierkulozom tipa avium, *Wietierinarija*, (4): 29.

Meissner, G., 1960: Atypische Mykobacterien. III. Mitteilung. Aviäre und avium-ähnliche Stämme, *Zentr. Bakter I. O*, **180**: 510.

Raška, K., 1959: K epidemiologické problematice bovinnoho typu tuberculosy u nas. *Československ. epidemiol., mikrobiol. immunol.* **8**: 317.

Schellner, H., 1959: Untersuchungen über die Lebensfähigkeit von Tuberkelbakterien des Abwassers auf beregneten Weideflächen. Mhefte prakt. Tierhk., Sonderteil, „Rindertuberkulose und Brucellose", **8**: 51. (Streszczenia: 1951 *Fleischwirtschaft*, **12**: 1029, 1960; *Med. Wet.*, **11**: 694).

Stryszak, A., 1960: Nieswoiste odczyny tuberkulinowe u bydła, *Med. Wet.*, **9**: 513.

Stanisław Fertig

AREA IRRIGATED WITH SEWAGE. ITS HYGIENIC AND SANITARY EVALUATION. II. MYCOBACTERIA IN RODENTS FROM IRRIGATED AREA

Summary

125 rodents from irrigated area and 25 animals from non-irrigated one were investigated on the presence of pathogenic mycobacteria.

In one case *Mycobacterium tuberculosis var. avium* was isolated from *Microtus arvalis*. The strain was virulent for hen. According to the author the role of rodents in irrigated area as reservoirs of mycobacteria is negligeable.

Adres autora:
Authors' address:

S. Fertig,
Wrocław, Plac Grunwaldzki 19/32

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1961, 10 : 433 - 438

Lesław Ogielski i *Zdzisław Zawadzki*

BADANIA TERENÓW NAWADNIANYCH SCIEKAMI POD WZGLĘDEM HIGIENICZNO-SANITARNYM III. BADANIA NAD OBECNOŚCIĄ PRĄTKÓW GRUŹLICY W SCIEKACH WYKORZYSTYWANYCH DLA CELÓW ROLNICZYCH

Z Katedry Higieny Produktów Zwierzęcych Wyższej Szkoły Rolniczej
we Wrocławiu

Wpłynęło dnia 15 maja 1961 r.

Streszczenie

Autorzy badali: a) ścieki miejskie surowe, b) ścieki oczyszczone w osadniku, c) wody ściekające drenami z pól nawadnianych, d) wodę rzeki Odry w odległości około 500 m poniżej ujścia wód ściekowych z pól nawadnianych. Tylko w próbkach a) i b) stwierdzili obecność zjadliwych prątków gruźlicy. Autorzy wnioskują, że gleba badanego terenu pól nawadnianych spełnia dobrze rolę filtru bakteryjnego w stosunku do prątków gruźlicy.

Stosowana we Wrocławiu metoda biologicznego oczyszczania ścieków miejskich polega na doprowadzeniu ich do osadników znajdujących się poza terenem miasta. Zachodzi tutaj proces tzw. wstępnego oczyszczania, trwający około 16 godzin, przy czym czasokres ten uzależniony jest od szybkości dopływu wód ściekowych z miasta, a tym samym od pojemności osadników. Po ich przejściu odprowadza się ścieki rowami na pola nawadniane. Na jedną kwaterę tych pól, o powierzchni około 7 ha, doprowadza się ścieki przez 24 godziny, a po zamknięciu dopływu pola podlegają kwarantannie przez trzy tygodnie i w tym czasie nie są eksploatowane. Gleba pola nawadnianego ma spełniać rolę filtru bakteryjnego, gdyż tu właśnie następuje ostateczne oczyszczenie wód ściekowych przed ich odprowadzeniem do Odry.

Celowość takiego wykorzystywania ścieków nie podlega dyskusji z ekonomicznego punktu widzenia (W i e r z b i c k i, 1952), ale nasuwają się poważne zastrzeżenia natury epidemiologicznej z uwagi na niebezpieczeństwo rozwleczenia drobnoustrojów chorobotwórczych i pa-

sożytów. Celem pracy było rozwiązanie problemu przeżywalności i zjadliwości prątków gruźlicy w ściekach oczyszczanych opisaną metodą.

Z zebranej literatury wynika, że prątki gruźlicy z reguły występują w ściekach sanatoriów i szpitali przeciwgruźliczych oraz mogą występować w ściekach miejskich, a także w niektórych ściekach przemysłowych takich zakładów jak rzeźnie, mleczarnie, zakłady utylizacyjne itp. Stwierdzono również obecność prątków w wodzie rzecznej po wprowadzeniu do niej ścieków nieoczyszczonych względnie niedostatecznie oczyszczonych (Macander, 1956; Dożańska, 1957), a poczynione obserwacje wykazują, że procesy samooczyszczania w naturalnych zbiornikach wodnych nie gwarantują zniszczenia tych drobnoustrojów, bowiem oporność prątków gruźlicy na czynniki zewnętrzne przyczynia się do zachowania przez nie żywotności i zjadliwości przez dłuższy okres czasu (Dożańska, 1957; Kołaczkowski, Kowalczyk i Żukowski, 1959). Wiadomo również, że każdy zbiornik wodny ma ograniczoną możliwość samooczyszczania się (Kluczycki, 1959).

Przedmiotem interesujących nas badań była również gleba pola nawadnianego, spełniająca rolę filtru bakteryjnego (Balicka i Sobieszczański, 1956, 1957a, 1957b) oraz stan sanitarny wód powierzchniowych zanieczyszczonych ściekami (Paluch, Radecka i Filipowicz, 1956 i 1957; Cabejszek, Koziorowski i Melanowski, 1957; Paluch, 1959; Paluch i Zdybiewska, 1959). Ciekawy przegląd dotychczasowego dorobku naukowego w dziedzinie badań nad mikrobiologią ścieków i wód powierzchniowych zanieczyszczonych ściekami dają w swojej pracy Just, Cabejszek i Ziemińska (1959). Poza pracą Schellnera (1959) brak jednak w literaturze konkretnych danych co do przeżywalności prątków gruźlicy w ściekach miejskich oczyszczanych w osadnikach oraz na polach nawadnianych takimi ściekami.

METODYKA BADAŃ

Badania przeprowadzono w okresie od lipca 1958 do grudnia 1960 roku. Do badań pobierano: a) ścieki surowe dopływające z Wrocławia do osadnika w Osobowicach, b) ścieki wypływające z osadnika, c) wody ściekające drenami z pól nawadnianych ściekami, d) wodę rzeczną z Odry w odległości około 500 m poniżej ujścia do rzeki wód ściekających z pól nawadnianych.

Próbki wymienione w punkcie a) pobierano tuż przed osadnikiem z rowów doprowadzających, a próbki b) tuż za osadnikiem z rowów odprowadzających na pola nawadniane. Próbki c) pobierano wprost z drenów, a próbki d) w odległości około 1.5 m od brzegu rzeki. Te ostatnie pobierano w miesiącach od marca do grudnia 1960, a więc w ostatniej fazie badań i stąd też mniejsza jest ilość badań tych próbek.

Do oznaczania obecności prątków gruźlicy w pobranych próbkach stosowano równolegle trzy metody: a) mikroskopową, b) hodowlaną na pożywkach stałych i płynnych, c) biologiczną na świnkach morskich.

Poszczególne próbki, w łącznej ilości 1000 ml, pobierano zlewką 50 ml i wlewano do termosów. Czas pobierania jednej próbki wynosił około 10 minut. W ten sposób uzyskany materiał wirowano przez 45-60 minut przy 2000 obrotów na minutę, a otrzymany osad poddawano homogenizacji. Celem uwolnienia od drobnoustrojów towarzyszących stosowano:

a) 10% roztwór wodny fosforanu trójsodowego, równoważny z 23% roztworem $Na_3PO_4 \cdot 12H_2O$, wg metody zalecanej przez Armstronga (K w a p i ń s k i, 1954);

b) bradosol (bromek β-fenoksy-etylo-dwumetylo-dwudecylo-amoniowy produkcji „Ciba") w ilości 1 ml 5% roztworu wodnego na 10 ml osadu, przy czasie kontaktu 50 minut; odczynnik ten zastosowano w oparciu o wyniki prac Wagenera, Rutza i Heukelekiana (D o ż a ń s k a, 1957);

c) 5% kwas solny i 4% wodorotlenek sodowy wg ogólnie przyjętych zasad — zalewając nimi osad w stosunku 1 : 1.

Każdorazowo stosowano dla kontroli po dwa z wyżej wymienionych odczynników.

Heukelekian (D o ż a ń s k a, 1957) przeprowadził badania nad możliwością zastosowania niektórych antybiotyków do uwolnienia próbek ścieków gruźliczych od drobnoustrojów towarzyszących. Autor zbadał wpływ penicyliny, gryzeiny, terramycyny oraz chloramfenikolu i stwierdził, że żaden z tych antybiotyków nie nadaje się do tego celu.

W pracy niniejszej wypróbowano modyfikację metody Heukelekiana i zastosowano penicylinę w ilości 200 j. o. na 1 ml osadu poddanego uprzednio homogenizacji. Dla kontroli wykonano równolegle wysiewy z materiału poddanego samej homogenizacji. Stwierdzono, że na 25 próbek poddanych tej metodzie postępowania w 3 przypadkach miało miejsce przerastanie posiewów, ale tylko przy wysiewie materiału poddanego samej homogenizacji.

Posiewy wykonano na pożywkach Löwensteina w modyfikacji Jensena, ATS oraz na podłożu Petragnaniego z glicerolem, bez glicerolu i na płynnych pożywkach Sautona, Youmansa i jajowej wg przepisu F e r t i g a (1961). Opracowany osad wysiewano w ilości po 0,5 ml na pożywki stałe w płytce Petriego i skoszone w probówce oraz do pożywek płynnych. Przy badaniu każdej próbki używano równolegle po dwa rodzaje pożywek stałych i płynnych.

Do prób biologicznych używano po dwie świnki morskie o wadze po około 250 g, poddane uprzednio próbie tuberkulinowej śródskórnej. Opracowany materiał w ilości po 1 ml wstrzykiwano podskórnie do węzła chłonnego pachwinowego i okolicy.

Obserwacja wysiewów i świnek morskich trwała do trzech miesięcy wg zasad ogólnie stosowanych w diagnostyce gruźlicy.

Z osadu otrzymanego po odwirowaniu materiału, przed dodaniem środków homogenizujących, a także po ich zastosowaniu, sporządzano preparaty mikroskopowe.

WYNIKI BADAŃ I WNIOSKI

Łącznie zbadano 150 próbek, a mianowicie: 46 próbek ścieków surowych, 46 próbek ścieków wypływających z osadnika, 46 próbek wody ściekającej drenami z pól nawadnianych ściekami, 12 próbek

wody rzecznej, do której odprowadzane są wody z pól nawadnianych ściekami.

Obecność prątków gruźlicy zjadliwych dla świnek morskich stwierdzono: sześciokrotnie w próbkach ścieków surowych (X 1958, VI 1959, VII 1959, XII 1959, V 1960 i VIII 1960) oraz trzykrotnie w próbkach ścieków wypływających z osadnika (XII 1958, II 1959 i VI 1960).

Nie stwierdzono natomiast obecności zjadliwych prątków gruźlicy w wodzie spływającej drenami z pól nawadnianych ściekami oraz w wodzie rzecznej.

Zjadliwe prątki gruźlicy występują więc zarówno w ściekach surowych jak i po przejściu przez osadnik. Występowanie ich będzie zrozumiałe, jeżeli zważymy, że ścieki przebywają w osadniku krótko, bo średnio 16 godzin. Czasokres ten uzależniony jest od szybkości dopływu z miasta. Osadnik jest jednak miejscem, w którym można by poddać ścieki dezynfekcji, a tym samym zapobiec przedostawaniu się prątków gruźlicy na pola nawadniane.

Gleba pola nawadnianego spełnia w tej metodzie oczyszczania ścieków miejskich rolę fitru. Uzyskane przez nas wyniki pozwalają sądzić, że na badanym terenie rolę tę spełnia ona dobrze w odniesieniu do badanych drobnoustrojów, gdyż nie stwierdzono ich obecności w wodzie spływającej drenami z pól nawadnianych, ani tym bardziej w wodzie rzecznej.

LITERATURA

Balicka, N., Sobieszczański, J., 1956: Żywotność *Escherichia coli* w glebie nawadnianej ściekiem miejskim. *Acta Microbiol. Polon.*, **5**: 207.

Balicka, N., Sobieszczański, J., 1957a: Gleba jako filtr bakteryjny przy rolniczym wykorzystywaniu ścieków miejskich. *Acta Microbiol. Polon.*, **6**: 269.

Balicka, N., Sobieszczański, J., 1957b: Wpływ gleby na *Escherichia coli* wprowadzone ze ściekami. *Acta Microbiol. Polon.*, **6**: 289.

Cabejszek, I., Koziorowski, B., Malanowski, Z., 1957: Badania higieniczno-sanitarne rzeki Wisły w rejonie Warszawy. *Roczn. PZH*, **8**: 325.

Dożańska, W., 1957: Występowanie prątków gruźlicy w ściekach, metody wykrywania i unieszkodliwiania przy oczyszczaniu ścieków. *Roczn. PZH*, **8**: 307

Fertig, S., 1960: Formy wzrostowe prątków na żółtku jaja kurzego. *Arch. Immunol. i Ter. Dośw.*, **8**: 77.

Just, J., Cabejszek, I., Ziemińska, S., 1959: Stan badań naukowych nad mikrobiologią ścieków i wód powierzchniowych zanieczyszczonych ściekami. *Acta Microbiol. Polon.*, **8**: 7.

Kluczycki, K., 1959: Podstawy biologicznego oczyszczania ścieków. *Acta Microbiol. Polon.*, **8**: 135.

Kołaczkowski, S., Kowalczyk, J., Żukowski, Z., 1959: Chlorowanie ścieków w sanatoriach przeciwgruźliczych. Cz. I. Zależność przeżywalności prątków od stężenia chloru i czasu jego działania. *Acta Microbiol. Polon.*, **8**: 181.

Kwapiński, J., 1959: Bakteriologia i serologia gruźlicy. PZWL, Warszawa
Macander, W., 1956: Badania nad prątkami kwasoopornymi w wodzie rzecznej, do której wpływają ścieki po przejściu przez oczyszczalnię. *Acta Microbiol Polon.*, **5**: 201.
Paluch, J., 1959: Charakterystyka mikrobiologiczna wód dorzecza południowej Wisły. *Acta Microbiol. Polon.*, **8**: 91.
Paluch, J., Radecka, S., Filipowicz, J., 1956: Stan sanitarny górnego biegu Wisły i jej dopływów oraz terenu zalewu w Goczałkowicach. *Acta Microbiol. Polon.*, **5**: 187.
Paluch, J., Radecka, S., Filipowicz, J., 1957: Stan bakteriologiczny wód górnego biegu Wisły i jej dopływów oraz terenu zalewu w Goczałkowicach *Acta Microbiol. Polon.*, **6**: 29.
Paluch, J., Zdybiewska, M., 1959: Charakterystyka niektórych bakterii wyizolowanych z wody filtrów pospiesznych na stacji wodociągowej w Kozłowej Górze. *Acta Microbiol. Polon.*, **8**: 67.
Schellner, H., 1959: Untersuchungen über die Lebensfähigkeit von Tuberkelbakterien des Abwassers auf beregneten Weideflächen. *Die Fleischwirtschaft*, **9**: 1029. (streszczenie).
Wierzbicki, J., 1952: Działanie wód ściekowych na glebę. WTN. Wrocław.

Lesław Ogielski and *Zdzisław Zawadzki*

AREA IRRIGATED WITH SEWAGE. ITS HYGIENIC AND SANITARY EVALUATION. III. OCCURRENCE OF TUBERCLE BACILLI IN URBAN SEWAGE USED FOR LAND IRRIGATION

Summary

Urban sewage of the city of Wrocław was examined for presence of virulent tubercle baccilli. 46 samples of raw sewage, 46 samples of sewage from the sedimentation tank, 46 samples of sewage effluent from irrigation pipes and 12 samples of river water were examined. Six strains of *Myc. tuberculosis* virulent for guinea pigs were isolated from raw sewage and three such strains from the effluent of sedimentation tank. No virulent mycobacteria were found in effluent from irrigation pipes or river water. According to authors the filtering capacity of the soil is the chief factor in elimination of virulent mycobacteria on irrigated area

Adres autorów:
Authors' address:

Prof. dr L. Ogielski, dr Z. Zawadzki,
Katedra Higieny Produktów Zwierzęcych,
WSR, Wrocław, ul. Norwida 29

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1961, **10** : 439 - 442

Leopold Ugorski

BADANIA TERENÓW NAWADNIANYCH SCIEKAMI POD WZGLĘDEM HIGIENICZNO-SANITARNYM. IV. BADANIA FAUNY TERENÓW NAWADNIANYCH ŚCIEKAMI W KIERUNKU NOSICIELSTWA SALMONELI I SHIGELI

Z Wojewódzkiego Zakładu Higieny Weterynaryjnej we Wrocławiu

Wpłynęło dnia 15 maja 1961 r.

Streszczenie

Gryzonie z terenów nawadnianych ściekami podobnie jak z terenów kontrolnych są tylko wyjątkowo nosicielami salmonel. Na 544 zbadanych zwierząt znaleziono tylko 3 przypadki nosicielstwa. Pałeczek *Shigella* nie wykryto ani razu.

Treść referowanego doniesienia dotyczy badań nad nosicielstwem i siewstwem salmoneli i shigeli u małych dzikich gryzoni złowionych na obszarach nawadnianych ściekami.

Sam fakt występowania wspomnianych drobnoustrojów w ściekach, wodach ściekowych oraz wodach powierzchniowych zanieczyszczonych ściekami został już przez cały szereg badaczy wielokrotnie potwierdzony i powszechnie uznany.

Wody ściekowe są środowiskiem, w którym pałeczki z rodzaju *Salomonella i Shigella* mogą przebywać, a w pewnych określonych warunkach nawet się rozmnażać.

Celem niniejszych badań było określenie w jakim stopniu ssaki, o których była mowa na wstępie, mogą stanowić czynnik ekspozycyjny w dynamice zachorowań na salmonelozy i shigelozy u ludzi i zwierząt.

Z pracą o podobnej tematyce nie zetknąłem się w dostępnym piśmiennictwie, wydaje się więc, że ilość publikacji z tego zakresu jest wyjątkowo skromna.

BADANIA WŁASNE

Badania prowadzono od czerwca 1958 roku do końca roku 1959. Łowione w tym okresie gryzonie pochodziły z terenów nawadnianych ściekami (Wrocław-Osobowice).

W 1958 roku zbadano 385 gryzoni, z tego 284 sztuki pochodziły ze wspomnianych pól irygacyjnych, 101 z terenów kontrolnych (okolice Wrocławia i Domasława) nie zraszanych wodami ściekowymi.

W roku 1959 zbadano 159 gryzoni. Znaczna ich ilość (125) pochodziła z terenów nawadnianych, a 34 sztuki z terenów kontrolnych.

Gatunkowo wśród złapanych gryzoni 70% stanowił nornik zwyczajny (*Microtus arvalis*), 25% nornica ruda (*Cletrionomys glareolus*) oraz 5% mysz polna (*Apodemus agrarius*). Ogółem zbadano 544 gryzonie: 407 z terenów nawadnianych ściekami, a 137 z terenów kontrolnych.

MATERIAŁY I METODY

Część gryzoni dostarczono do badań w stanie żywym. Natychmiast po uśpieniu chloroformem przystępowano do wykonania posiewów bakteriologicznych: a) bezpośrednich — na podłoże stałe SS i podłoże Gassnera, później na pożywkę Endo z dodatkiem 5% żółci; b) namnażających — na podłoże wzbogacające SF wg Leifsona, z którego po 24 godzinach dokonywano przesiewów na agar McConkeya względnie Gassnera.

Wysiewano mózg, szpik kostny, krew, wątrobę, śledzionę, nerki, wycinek jelita cienkiego, wycinek jelita grubego oraz kał.

Dalsze postępowanie z wyhodowanymi pałeczkami gramoujemnymi i laktozoujemnymi oparte było na ogólnie przyjętych metodach laboratoryjnej diagnostyki *Salmonella* i *Shigella*.

Wykonaną analizę receptorów dla typowego określenia salmoneli każdorazowo potwierdzał Krajowy Ośrodek Salmonelowy w Gdyni.

WYNIKI PRACY

Ze zbadanego w roku 1958 materiału udało się dwukrotnie wyhodować pałeczkę tyfusu mysiego (*S. typhimurium*) z nornika zwyczajnego oraz jeden raz z myszy polnej. U norników pałeczkę tę stwierdzono w wątrobie i przewodzie pokarmowym. U myszy wydzielono ją z wszystkich narządów wewnętrznych i przewodu pokarmowego Wyizolowane szczepy *S. typhimurium* zostały określone metodą Hohna i Herrmanna (A-H-reihe) jako typ pełny (Volltyp). Wspomniane trzy gryzonie pochodziły z terenów nawadnianych ściekami.

W roku 1959 tylko jeden raz udało się wydzielić z wątroby i śledziony nornicy rudej pałeczkę *Salmonella dublin*. Nornicę tę złapano na terenach kontrolnych. Z 544 gryzoni nie udało się ani w jednym przypadku wyosobnić pałeczek z rodzaju *Shigella*.

OMÓWIENIE PRACY

Salmonele stwierdzono u 3 sztuk gryzoni pochodzących z terenów nawadnianych ściekami, co stanowi 0,7% zbadanej ilości. Na terenach kontrolnych jeden dodatni wynik badań bakteriologicznych stanowi 0,8% całości zbadanego materiału.

Mimo dość istotnej dysproporcji w ilościach zbadanych ssaków pochodzących z pól irygowanych i kontrolnych otrzymane wyniki wskazywałyby na brak istotnych różnic w stopniu zakażenia salmonelami u obu wymienionych grup.

Ugorski* przeprowadzał podobne badania w rezerwacie milickim, uzyskując podobne wyniki. Zbadano 4 szczury piżmowe, 9 szczurów wodnych, 18 myszy polnych, 3 kuny, 2 lisy, 2 krety, 1 jastrzębia, 3 wrony, 1 kruka i 12 wróbli. Wyhodowano *S. typhimurium* ze szczura wodnego i jastrzębia. Z uwagi na to, że tereny rezerwatu nie stykają się z wodami ściekowymi, można je zaliczyć do obiektów kontrolnych.

Stwierdzono zatem brak specjalnych różnic ilościowych w nosicielstwie salmoneli u małych dzikich gryzoni odłowionych na polach irygowanych i nie irygowanych ściekami, stanowiących teren naszych zainteresowań.

S. typhimurium jest jednym z najczęściej występujących typów salmoneli u zwierząt na terenach woj. wrocławskiego, *S. dublin* jednak należy raczej do rzadkości. Szczegół powyższy winien być wzięty pod uwagę zarówno przez epidemiologów, jak i epizoocjologów.

Wspomniany cykl badań jest wstępem do szeroko zakrojonych prac z tego zakresu.

Uzyskane wyniki upoważniają do stwierdzenia, że dzikie gryzonie żyjące na terenach nawadnianych ściekami tylko bardzo rzadko mogą być nosicielami salmoneli.

Leopold Ugorski

AREA IRRIGATED WITH SEWAGE. ITS HYGIENIC AND SANITARY EVALUATION. IV. INVESTIGATION ON *SALMONELLA* AND *SHIGELLA* INFECTION IN RODENTS FROM IRRIGATED AREA

Summary

544 rodents from irrigated area and from control, not-irrigated one, were investigated on the presence of salmonellae and shigellae. Only two animals from the irrigated area and one from the control area were found to harbour salmonellae (*S. typhimurium* — 2 strains, *S. dublin* — 1 strain). No shigellae were found in any of the examined animals.

Adres autora
Author's address:

Dr L. Ugorski,
WZHW, Wrocław,
ul. Rodakowskiego 6

* Praca nie ogłoszona.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1961, 10 : 443 - 446

Stanisława Jasińska

BADANIA TERENÓW NAWADNIANYCH SCIEKAMI POD WZGLĘDEM HIGIENICZNO-SANITARNYM. V. BADANIA NAD WYSTĘPOWANIEM *LISTERIA MONOCYTOGENES*, WŁOSKOWCA RÓŻYCY I BAKTERIOFAGÓW ANTY-*LISTERIA* U MAŁYCH SSAKÓW Z PÓL NAWADNIANYCH ŚCIEKAMI ORAZ W WODACH ŚCIEKOWYCH

Z Katedry Mikrobiologii Wydziału Weterynaryjnego
Wyższej Szkoły Rolniczej we Wrocławiu

Wpłynęło dnia 10 kwietnia 1961 r.

Streszczenie

Zbadano narządy wewnętrzne, przewody pokarmowe i mózgi 383 małych ssaków z pól nadwadnianych ściekami na obecność *Listeria monocytogenes* i włoskowca różycy z wynikiem ujemnym. Z 78 próbek wody ściekowej wyizolowano 1 szczep *L. monocytogenes* typ serologiczny *4b*, oraz 2 rodzaje bakteriofaga anty-*Listeria* typ *1*, *4a* i *4b*.

W Polsce dotychczas nie badano wody ani wód ściekowych na obecność listerii. Osufiew i współpracownicy (1959) podają, że z 440 próbek wody pobieranych z rzek w przeciągu dwu lat wyizolowali 5 szczepów włoskowca różycy i 1 szczep listerii. Z gryzoni odłowionych na terenach objętych badaniami wyizolowali 2 szczepy różycy i 1 szczep listerii.

MATERIAŁY I METODY

Do badań użyto narządy wewnętrzne, przewody pokarmowe i mózgi 383 ssaków z gatunku *Microtus arvalis* oraz *Sorex araneus*, odłowionych na terenach objętych badaniami. Przebadano również 78 próbek wody ściekowej: a) pochodzącej bezpośrednio z miasta, b) pochodzącej z osadników i c) po przejściu przez glebę i dreny. Próbki wody pobierano do termosów w ilości 1 l.

Narządy wewnętrzne, przewody pokarmowe i mózgi po dokładnym roztarciu w moździeżu Weiglowskim wysiewano na bulion cukrowy, agar bromotymolowy i w niektórych przypadkach na agar ziemniaczany. Część materiału zadawano 50% glicerolem i pozostawiono w 4° na przeciąg 2-3 tygodni. W tym czasie dokonywano dwukrotnie przesiewu na wyżej wspomniane pożywki stałe (Gray i współpracownicy, 1948). W 64 przypadkach wykonano aglutynację z surowicą gryzoni i antygenem *O L. monocytogenes*. Zbadano również narządy wewnętrzne 15 świnek morskich szczepionych narządami wewnętrznymi odłowionych małych ssaków. Wykonano też aglutynację z surowicami tych świnek morskich i antygenem *O Listeria*.

Po odwirowaniu próbek wód ściekowych przy 3000 obrotów/min w ciągu godziny płyn znad osadu dodawano do dwugodzinnej hodowli bulionowej szczepu *Listeria* w stosunku 1 : 9. Chcąc uzyskać hodowlę baktierofaga anty-*Listeria*, po 30-60 minutach inkubacji w 37° bulion wirowano i płyn znad osadu stosowano do dalszych pasaży. W innych seriach dla uzyskania lizatu fagowego dodawano chloroformu lub tymolu w końcowej fazie.

Osad po odwirowaniu próbek wód ściekowych wysiewano na pożywki cukrowe i bromotymolowe. Posiewy na bulionie przetrzymywano w temperaturze pokojowej i przesiewano ponownie na pożywki stałe.

WYNIKI

Badania bakteriologiczne małych ssaków z pól nawadnianych ściekami prowadzono od roku 1957 do 1960. W tym czasie zbadano narządy wewnętrzne, przewody pokarmowe i mózgi 383 zwierząt na obecność włoskowca różycy i listerii z wynikiem ujemnym.

Aglutynacja z surowicami *Microtus arvalis* wykazała na 64 próby u 13 sztuk dodatnie miano 1 : 20. Badano też świnki morskie, szczepione narządami wewnętrznymi małych ssaków, bakteriologicznie i serologicznie — z wynikiem ujemnym.

Od lipca 1959 r. przystąpiono do badań wód ściekowych na obecność włoskowca różycy, *L. monocytogenes* oraz bakteriofagów anty-*Listeria*. Otrzymanie bakteriofagów w wyższym mianie było utrudnione, gdyż, jak dotychczas, nie wyizolowano bakteriofagów przeciwko tym pałeczkom (Seeliger, 1955). Stosując wyżej opisane metody izolowania okazało się, że powstawały łysinki na szczepach detektorowych typu *1*, *4a* i *4b*. Zauważono, że w seriach po wirowaniu lub dodaniu chloroformu uzyskiwano łysinki bardzo drobne. Po zastosowaniu tymolu łysinki były duże. Uzyskano zatem dwa rodzaje fagów, na które szczepy *Listeria* typ *1*, *4a* i *4b* były wrażliwe. Stosując powyższe metody oraz liczne pasaże udało się uzyskać jedynie niskie miana bakteriofaga (10^{-3}). Nawet stosowanie metody z pożywkami stałymi nie zwiększało miana. Ponieważ nie ma dotychczas opisanej metody mnożenia faga anty-*Listeria*, przypuszcza się, że stosowane metody w badaniach własnych nie były właściwe. Być może, że uzyskany fag nie był fagiem homologicznym dla tych pałeczek. Ścieki są źródłem licz-

nych fagów, a z drugiej strony pałeczki listerii mają wspólne antygeny z innymi grupami drobnoustrojów. Prace nad wyizolowaniem faga homologicznego dla *Listeria*, jak i nad metodami namnażania tych fagów są w toku.

W badaniu bakteriologicznym osadu ze ścieków a, b, c uzyskano w jednym przypadku wynik pozytywny. W posiewie bezpośrednim i z bulionu z próbki wody ściekowej pochodzącej z osadnika wyizolowano pałeczki morfologicznie, biochemiczne i serologicznie odpowiadające *L. monocytogenes*. Szczep ten oznaczony *18 59* określony został przez prof. Graya (Montana, USA) jako typ serologiczny *4b*. Szczep *18/59* bezpośrednio po wyizolowaniu i przechowywaniu na pożywce Dorseta był niechorobotwórczy dla świnek morskich i myszy białych. Po szeregu pasaży na pożywce mózgowej stał się chorobotwórczy dla tych zwierząt.

LITERATURA

Gray, M. L., Stafeth, H. J., Thorp, F., Sholl, L. B., Riley, W. F., 1948: A new technique for isolating listerellae from the bovine brain. *J. Bact.*, **55**: 471.

Osufiew, H. G., Petrow, W. G., Szligina, K. N., 1959: Ob obnaruženii wozbuditielej erizipeloida i listerioza w wodie ruczjow. *Ż. Mikrobiol. Epidemiol.* **3**: 89.

Seeliger, H., 1955: Listeriose. Johan Ambrosius Barth, Leipzig.

Stanisława Jasińska

AREA IRRIGATED WITH SEWAGE. ITS HYGIENIC AND SANITARY EVALUATION. V. OCCURRENCE OF *LISTERIA MONOCYTOGENES*, *ERYSIPELOTHRIX RHUSIOPATHIAE* AND BACTERIOPHAGES ANTI-*LISTERIA* IN SMALL MAMMALIA FROM IRRIGATED AREA AND IN SEWAGE

Summary

All examined rodents and other small mammalia were free from *Listeria*- or *Erysipelothrix*-infection. From sewage one strain of *L. monocytogenes*, type 4b, was isolated. From the same sewage two strains of bacteriophages specific for *Listeria* were recovered. Properties of these phages will be described in a separate publication.

Adres autorki:
Author's address:

Dr S. Jasińska,
Wrocław 9,
ul. Szanieckiego 77/4

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1961, 10 : 447 - 456

Józef Zwierz, Krystyna Karmańska, Danuta Konarska
i Eleonora Wasilewska

BADANIA TERENÓW NAWADNIANYCH WODAMI ŚCIEKOWYMI POD WZGLĘDEM HIGIENICZNO-SANITARNYM. VI. BADANIA FAUNY TERENÓW NAWADNIANYCH W KIERUNKU NOSICIELSTWA LEPTOSPIR W LATACH 1957-1959

Z Zakładu Badań nad Leptospirozą Instytutu Weterynarii we Wrocławiu

Wpłynęło dnia 15 maja 1961 r.

Streszczenie

W badaniach bakteriologicznych, serologicznych i biologicznych stwierdzono, że wśród małych ssaków odsetek reagujących dodatnio na leptospirozę zmienia się na terenach nawadnianych i kontrolnych z roku na rok, przypuszczalnie w dużej mierze zależnie od warunków klimatycznych. Odsetek zwierząt dodatnio reagujących na terenach nawadnianych jest mniej więcej taki sam jak na terenach kontrolnych — wiejskich. Również odsetek dodatnio reagujących w odczynie serologicznym zwierząt domowych jest na terenach nawadnianych podobny do spotykanego w rejonach nie nawadnianych.

Zadaniem naszego Zakładu było stwierdzenie czy małe ssaki bytujące na terenach nawadnianych ściekami są nosicielami leptospir i czy stopień ich ewentualnego zainfekowania jest większy niż gryzoni z innych terenów. W tym celu obok zwierząt odławianych na terenach irygacyjnych, w drugim i trzecim roku badań, uwzględniono także zwierzęta pochodzące z dwóch terenów kontrolnych: miejskiego (*W*) i wiejskiego (*D*).

Podobnie badania serologiczne zwierząt domowych pasących się na terenach nawadnianych wodami ściekowymi miały wyjaśnić, czy kontakt ze ściekami przyczynia się do zwiększenia możliwości zakażenia leptospirami, zwłaszcza bydła i koni.

Wymienione zagadnienia starano się rozwiązać w badaniach trwających w latach 1957-1959.

BADANIA WŁASNE

MATERIAŁ I METODY

Każde dostarczone zwierzę usypiano i poddawano sekcji. Z serca pobierano krew na odczyn aglutynacyjno-lityczny. Z wycinków wątroby, nerek z nadnerczem i pęcherza moczowego sporządzano rozcier, którym zakażano podskórnie świnkę morską (o wadze 200,0-300,0 g) w ilości 1 ml, lub chomika syryjskiego w ilości 0,5 ml. Po kilka kropli rozcieru posiewano na 4 probówki z ca 2 ml pożywki Ungermanna w każdej. Zakażonej śwince morskiej mierzono temperaturę przez 3 tygodnie. Po 5 dniach od zakażenia pobierano krew z serca i posiewano na 4 probówki z pożywką Ungermanna. Po 15 i 30 dniach pobierano ponownie krew z serca świnki w celu zbadania w odczynie aglutynacyjno-litycznym. W późniejszym terminie (po 3-4 miesiącach) zakażone zwierzęta usypiano, a rozcier ich narządów posiewano na pożywkę (każdy na 4 probówki).

W roku 1957 używano świnek i chomików, natomiast w 1958 zakażano jedynie świnki morskie. Wszystkie posiewy przeglądano po 5, 10, 15, 20 i 30 dniach inkubacji. Po tym terminie okresy między poszczególnymi przeglądami wynosiły od 2 do 3 tygodni.

Wszystkie badania serologiczne nastawiano rozpoczynając od rozcieńczenia 1 : 10 aż do miana granicznego z następującymi serotypami leptospir: *Leptospira icterohaemorrhagiae, L. canicola, L. grippotyphosa*; *L. pomona, L. sejroe, L. saxkoebing, L. mitis, L. autumnalis, L. australis A, L. australis B, L. bataviae* i *L. bovis*.

Użytym do badań świnkom morskim mierzono przed zakażeniem temperaturę przez okres co najmniej 2 tygodni. Surowice ich nastawione w odczynie aglutynacyjno-litycznym reagowały ujemnie.

Zastosowane przez nas metody badań dawały 5 możliwości wykrycia kontaktu gryzonia z zarazkiem, a mianowicie: 1. dodatni wynik serologiczny z surowicą badanego zwierzęcia, 2. dodatni wynik serologiczny z surowicą zakażonej świnki morskiej lub chomika syryjskiego, 3. dodatni wynik posiewu narządów gryzonia, 4. dodatni wynik posiewu krwi świnki zakażonej, 5. dodatni wynik posiewu narządów zakażonej świnki lub chomika.

W ten sposób przeprowadzano badania w latach 1957-1958. Natomiast w roku 1959 technika badań uległa pewnej modyfikacji: 1. zamiast rozcierów na pożywki posiewano malćnkie skrawki wątroby i nerek. Posiewy przeglądano w odstępach tygodniowych przez miesiąc, a następnie co 2 tygodnie; 2. zaniechano wykonywania prób biologicznych pozostając jedynie przy serologicznych i bakteriologicznych.

WYNIKI

Badania małych ssaków. Wyniki badań z roku 1957 zawiera tabela I. Najwyższe miano stwierdzono w surowicy gryzonia i surowicy zakażonej świnki było jednakowe i wynosiło 1 : 1280.

Ogółem w roku 1957 poddano badaniu 292 ssaki z terenów nawadnianych wodami ściekowymi (*Microtus arvalis, Sorex araneus, Apodemus agrarius* i *Neomys fodiens*) i stwierdzono, że 41 z nich zetknęło się już z zarazkiem.

W roku 1958 obok małych ssaków pochodzących z terenów nawadnianych wodami ściekowymi badano również zwierzęta z dwóch

Tabela I

Wyniki badania małych ssaków na zakażenie leptospirami
Results of examination of small mammalia for leptospirosis

Gatunek zwierzęcia Species	Liczba przebadanych zwierząt Number of examined animals	Wyniki Results: Ujemne Negative	Wyniki Results: Dodatnie Positive	Zwierzęta z dodatnim odczynem serologicznym z *L. grippotyphosa* (miana surowicy) Animals with positive serological test with *L. grippotyphosa* (titer of sera): 1:10—1:100	1:100—1:400	1:400 1:800	1:800	Dodatnie wyniki serologiczne z *L. grippotyphosa* u świnek morskich zakażonych materiałem badanym (miana surowic) Positive for *L. grippotyphosa* serological test in guinea pigs infected with examined material (titer of sera): 1:10—1:100	1:100—1:400	1:400—1:800	1:800	Wzrost leptospir w posiewach z: narządów badanych małych ssaków — Growth of leptospirae in cultures started with: internal organs of examined small mammallia	Wzrost leptospir w posiewach z: narządów chomików zakażonych eksperymentalnie — Growth of leptospirae in cultures started with: internal organs of hamsters infected with material examined
Rok 1957, tereny nawadniane ściekami — 1957, area irrigated with sewage													
Microtus arvalis	264	225	39	10 (1 ict. 1 sej.)	2	1	3	21 (3 sej. 1 bov.)	3 (1 ict.)	1	1	8	2
Sorex araneus	16	15	1	—	—	—	—	1 (ict.)	—	—	—	—	—
Apodemus agrarius	10	9	1	1 (ict.)	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Neomys fodiens	2	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Razem Total	292	251	41	11 (2 ict. 1 sej.)	2	1	3	22 (3 sej. 1 bov. 1 ict)	3 (1 ict.)	1	1	8	2
Rok 1958, tereny nawadniane ściekami — 1958, area irrigated with sewage													
Microtus arvalis	235	137	98	23	4		8	54	14	6	4	20	•
Sorex araneus *Apodemus agrarius* *Cletrionomys glareolus*	3	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	•
Razem Total	238	140	98	23	4	—	8	54	14	6	4	20	•
Rok 1958, tereny kontrolne *W* (miasto) — 1958, control area *W* (the city)													
Microtus arvalis	6	1	5	1	—	—	—	1	1	—	2	3	•
Sorex araneus *Arvicola terrestris* *Pitymus subterraneus* *Apodemus agrarius*	3	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	•
Cletrionomys glareolus	19	13	6	1	—	—	—	5	—	—	—	—	•
Razem Total	13	13	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	•
Rok 1958, tereny kontrolne *D* (wieś) — 1958, control area *D* (the country)	41	30	11	2	—	—	—	6	1	—	2	3	•
Microtus arvalis	120	66	54	18	3	2	2	17	4	1	9	21	•
Sorex araneus	1	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	•
Razem Total	121	67	54	18	3	2	2	17	4	1	9	21	•
Rok 1959, tereny nawadniane ściekami — 1959, area irrigated with sewage													
Microtus arvalis	151	142	9	6	2	—	—	—	—	—	—	2	•
Apodemus agrarius	75	71	4	4	—	—	—	—	—	—	—	—	•
Cletrionomys glareolus	7	7	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	•
Apodemus flavicollis	11	11	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	•
Apodemus sylvaticus	1	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	•
Razem Total	245	232	13	10	2	—	—	—	—	—	—	2	•
Rok 1959, tereny kontrolne *W* (miasto) — 1959, control area *W* (the city)													
Microtus arvalis	20	20	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	•
Apodemus agrarius	56	56	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	•
Cletrionomys glareolus	17	17	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	•
Apodemus flavicollis	3	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	•
Apodemus sylvaticus	1	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	•
Mus musculus	1	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	⊖
Razem Total	98	98	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	•
Rok 1959, tereny kontrolne *D* (wieś) — 1959, control area *D* (the country)													
Cletrionomys glareolus	11	11	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	•

terenów kontrolnych: środowiska miejskiego — *W* i środowiska wiejskiego — *D*.

Zbadano 238 zwierząt z terenów nawadnianych wodami ściekowymi, należących do 4 gatunków: *M. arvalis*, *S. araneus*, *Cletrionomys glareolus* i *A. agrarius*, przy czym ostatnie 3 gatunki były reprezentowane jedynie przez pojedyncze osobniki. Ogółem wśród 238 badanych małych ssaków 98 reagowało dodatnio i 140 ujemnie. Pozostałe wyniki podaje tabela I.

W zakresie badań fauny z terenów kontrolnych *W* (środowisko miejskie) zbadano 41 sztuk małych ssaków, należących do 6 gatunków (tabela I): 11 z nich reagowało dodatnio, 30 ujemnie.

Z terenów kontrolnych *D* (środowisko wiejskie), zbadano 121 zwierząt (*M. arvalis* — nornik zwyczajny i jeden osobnik — *S. araneus* ryjówka aksamitna (Tabela I). Na 121 zbadanych zwierząt z terenów *D* otrzymano 54 wyniki dodatnie. Pozostałe były ujemne.

Tabela II

Wyniki badań serologicznych zwierząt domowych na zakażenie leptospirami
Results of serological examination of domestic animals for leptospirosis

Rok Year	Zwierzę Animal	Ilość zbadanych Number of examined	Wynik Results: Ujemne — Negative	Wynik Results: Dodatnie — Positive	Wśród dodatnich reagowało Among positive reacted: w mianie in titer	*L. icterohaemorrhagiae*	*L. grippotyphosa*	*L. sejroe*	*L. saxkoebing*	*L. australis A*	*L. australis B*	*L. pomona*	*L. Tomaszów*
1957	bydło cattle	126	118	8	1:100 — 1:400	1	3	2	1	1	—	—	—
1961	bydło cattle	84	66	18	1:400 — 1:800	—	6	—	—	2	6	1	—
					1:400 — 1:800	2	—	—	—	—	1	—	
					1:100 — 1:400	3	11	6	—	3	6	—	4
1961	konie horses	84	30	54	1:400 — 1:800	—	10	1	—	1	7	—	—
					1:800	—	2	—	—	—	—	—	—

W 1958 r. poddano badaniu 400 małych ssaków (łącznie ze wszystkich trzech terenów). W badaniach serologicznych surowic zwierząt najwyższe otrzymane miano wynosiło 1 : 3200, natomiast w surowicach zakażonych świnek 1 : 5120. Wyizolowano 44 szczepy *Leptospira*.

Badania w roku 1959 obejmowały obok terenu badawczego również tereny kontrolne *W* i *D*. Ogólna ilość zbadanych w tym roku gryzoni wynosiła 354.

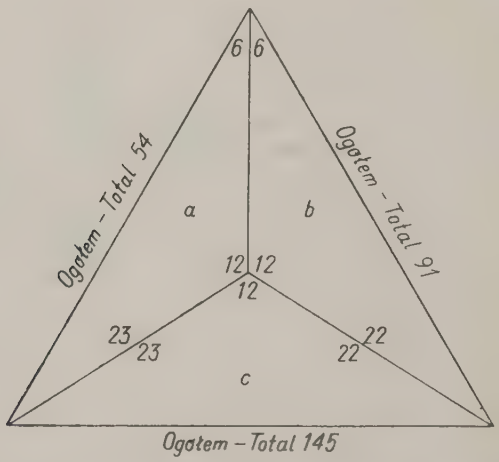
Z terenów nawadnianych wodami ściekowymi zbadano 245 małych ssaków z następujących gatunków: *M. arvalis, A. agrarius, Cl. glareolus, A. flavicollis* i *A. sylvaticus*. Na przebadanych 245 gryzoni, 232 dało wynik ujemny, a 13 dodatni. Wyniki przedstawia tabela I.

Z terenów kontrolnych *W* dostarczono 98 gryzoni. U żadnego z nich nie otrzymano wyniku dodatniego (tabela I).

Z terenów kontrolnych *D* zbadano tylko 11 sztuk *Cl. glareolus* — wszystkie z wynikiem ujemnym (tabela I).

Z posiewów narządów wyizolowano dwa szczepy leptospir.

Zgodność pomiędzy wynikami poszczególnych prób: a) odczynem serologicznym z surowicą badanego zwierzęcia, b) odczynem serologicznym z surowicą eksperymentalnie zakażonej świnki morskiej



Rys. 1. Zgodność wyników poszczególnych odczynów

a — posiew z narządów ssaka, b — dodatni odczyn serologiczny z surowicą badanego zwierzęcia, c — dodatni odczyn serologiczny z surowicą eksperymentalnie zakażonej świnki morskiej

Fig. 1. Correlation between different tests for leptospira-infection in small mammalia

a — isolation of leptospirae from small mammalia, b — positive serological test with serum of examined small animal, c — positive serological test with serum of guinea pig infected with material from examined small mammalia

i c) posiewem z narządów badanego zwierzęcia stwierdzono wielokrotnie. Ilustruje to rys. 1 opracowany na podstawie wyników trzyletnich badań.

Badania zwierząt domowych. Obok małych ssaków w roku 1957 zbadano serologicznie również pewną ilość bydła pasącego się na terenach nawadnianych wodami ściekowymi. Na 126 surowic nastawianych w odczynie aglutynacyjno-litycznym otrzymano 8 wyników dodatnich (1 z *L. icterohaemorrhagiae*, 3 z *L. grippotyphosa*, 2 z *L. sejroe*, 1 z *L. saxkoebing* i 1 z *L. australis A*) w rozcieńczeniu od 1 : 100 do 1 : 400.

Tabela III

Ogólne wyniki badań małych ssaków na obecność zakażenia leptospirami
Results of three years research of small mammalia for leptospirosis

Rok Year	Tereny badań Area examined	Ogólna ilość zbadanych zwierząt Total number of examined animals	W tym z wynikiem dodatnim Positive results		Ilość izolowanych szczepów Number of isolated strains
			Ilość Number	Procent badanych Per cent of examined	
1957	nawadniane irrigated	292	41	14,04	10
1958	nawadniane irrigated	238	98	42,82	20
1958	kontrolne *W* control *W*	41	11	26.82	3
1958	kontrolne *D* control *D*	121	54	44,62	21
1959	nawadniane irrigated	245	13	5,30	2
1959	kontrolne *W* control *W*	98	—		
1959	kontrolne *D* control *D*	11	—	—	

W roku 1961 zbadano 168 surowic pochodzących od zwierząt domowych wypasanych na polach irygacyjnych. Na 84 surowic bydła 15 reagowało w mianie od 1 : 100 do 1 : 400 (6 z *L. grippotyphosa*, 6 z *L. australis B*, 2 z *L. australis A* i 1 z *L. pomonae*) i 3 w mianie od 1 : 40 do 1 : 800 (2 z *L. icterohaemorrhagiae* i 1 z *L. australis B*).

Zbadano też 84 surowice koni, z czego otrzymano 54 wyniki dodatnie: 33 w mianie od 1 : 100 do 1 : 400 (11 z *L. grippotyphosa*, 6 z *L. sejroe*, 6 z *L. australis B*, 4 ze szczepem *Tomaszów I*, 3 z *L. icterohaemorrhagiae* i 3 z *L. australis A*), 19 w mianie od 1 : 40 do 1 : 800 (10 z *L. grippotyphosa*, 7 z *L. australis B*, 1 z *L. sejroe* i 1 z *L. australis A*), natomiast w rozcieńczeniu 1 : 800 reagowały tylko dwie surowice, obie z *L. grippotyphosa*.

Ogółem zbadano 294 surowice zwierząt dużych, w tym: 210 surowic bydła i 84 konii. Wyniki badań zwierząt domowych przedstawia tabela II.

Tabela IV

Średnia miesięczna temperatury (w °C)
Average monthly temperature (in °C)

Rok Year	miesiące											
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
1957	−0,4	+3,2	+4,6	+7,9	+11,0	+18,4	+19,2	+15,9	+12,4	+8,9	+5,4	-0,6
1958	−1,5	1,5	-1,3	+5,2	15,2	+15,5	+18,7	+17,2	+13,7	+9,8	+4,5	1,9
1959	-0,2	2,5	5,9	+9,2	13,6	+17,1	+20,2	+18,2	+11,8	+7,7	+3,4	1.3

Opady miesięczne sumarycznie (mm)
Fall per month (mm)

Rok Year	miesiące											
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
1957	18,7	43,3	47,5	7,3	23,9	28,6	154,6	76,6	66,1	5,9	7,4	27,7
1958	22,4	28.3	24,3	41.9	118,7	107,1	117,2	31,5	45,6	70,8	9,7	32,1
1959	11,9	6.7	24,8	48,6	14,0	46,1	113,1	21,5	1,0	13,0	22,5	49,7

DYSKUSJA

Badania małych ssaków pochodzących z terenów nawadnianych wodami ściekowymi przeprowadzono w trzech kolejnych latach (1957-1959): trwały one od początku czerwca do końca listopada, a nawet do pierwszych dni grudnia. Wyniki otrzymane w poszczególnych latach różniły się między sobą w sposób zasadniczy: podczas gdy w roku 1957 ca 14,04% gryzoni zetknęło się z zarazkiem, w roku 1958 otrzymano ca 42,02%, a w roku 1959 zaledwie ca 5,30% wyników dodatnich. Badania roku 1957 były uważane jako wstępne i obejmowały tylko tereny nawadniane wodami ściekowymi. W latach 1958 i 1959 obok fauny z terenów właściwych zbadano jako kontrolę zwierzęta pochodzące z dwóch innych środowisk: miejskiego (*W*) i wiejskiego (*D*). Porównanie wyników uzyskanych w badaniach drobnych

ssaków z tych terenów pozwala na ewentualną ocenę stopnia nosicielstwa i niebezpieczeństwa jakie stanowiłyby w roku 1958 i 1959 gryzonie z terenów nawadnianych ściekami. Tabela III przedstawia wyniki badań tych trzech terenów w kolejnych latach.

Widoczne jest, że w roku 1958 ilość zainfekowanych gryzoni była dużo większa niż w latach 1957 i 1959.

Analizując badania 1958 roku można by stwierdzić, że różnica jaka występuje między gryzoniami z właściwych terenów badań, a gryzoniami pochodzącymi z terenów kontrolnych *D* (a więc również ze środowiska wiejskiego) nie jest duża, przy czym stopień zainfekowania był nawet o 2,6% większy na terenach kontrolnych.

Fakt ten przemawiałby za tym, że małe ssaki bytujące na terenach nawadnianych wodami ściekowymi nie są w jakiś szczególny sposób narażone na niebezpieczeństwo zarażenia leptospirami. Wprawdzie u zwierząt dostarczonych z terenów kontrolnych *W* otrzymano prawie o 50% mniej wyników dodatnich, nie należy jednak zapominać, że teren *W* był środowiskiem miejskim, a więc czynniki sprzyjające zakażeniu mogły być zupełnie inne.

W roku 1959 otrzymano bardzo mało, bo zaledwie 5,3% wyników dodatnich w badaniach terenów nawadnianych wodami ściekowymi, przy czym badania zwierząt z terenów kontrolnych dały wyniki ujemne. Ten ostatni fakt nie podważa w niczym poprzednich rozważań, ponieważ w roku 1959 zbadano stosunkowo mało gryzoni z terenów kontrolnych, zwłaszcza z terenów *D*.

Porównując wyniki badań drobnych ssaków z terenów nawadnianych wodami ściekowymi w kolejnych latach można stwierdzić, że ilość zainfekowanych zwierząt podlega wielkim wahaniom (tabela III). Zjawisko to możnaby częściowo wytłumaczyć wpływami czynników atmosferycznych, ponieważ wiadomo, że w szerzeniu się leptospiroz dużą rolę odgrywa odpowiednia wilgotność i temperatura środowiska. Tabela IV przedstawia średnie miesięczne temperatury oraz sumaryczną ilość opadów w latach, w których przeprowadzano badania.

W 1957 roku maj i czerwiec były stosunkowo suche: większe opady wystąpiły dopiero w lipcu (154,6 mm) i częściowo w sierpniu (76,6 mm). Średnia temperatury w maju wynosiła tylko 11,0°. Przypuszczalnie miało to wpływ na fakt, że pierwsze bezpośrednie wyniki dodatnie otrzymano dopiero we wrześniu.

Rok 1958 charakteryzował się dużymi opadami w miesiącach: maju (118,7 mm), czerwcu (107,1 mm) i lipcu (117,2 mm), co przy średniej temperaturze maja, wynoszącej 15,2°, stosunkowo wcześnie stwarzało dogodne warunki dla przetrwania leptospir w środowisku zewnętrznym, a tym samym umożliwiało kontakt zarazka z gryzoniami bytującymi na danym terenie.

Natomiast w roku 1959 w maju, czerwcu i sierpniu opadów było niewiele, jedynie w lipcu wystąpiło ich więcej (113,1 mm). Można by więc sądzić, że mały stopień zainfekowania gryzoni w tym roku pozostawał w związku z tym właśnie faktem. Trzeba jednak zaznaczyć, że czynniki atmosferyczne tylko w pewnym stopniu mogłyby tłumaczyć różne dla poszczególnych lat rozprzestrzenienie leptospir wśród drobnych ssaków, gdyż w szerzeniu się nosicielstwa tego zarazka niewątpliwie odgrywa rolę jeszcze wiele innych czynników.

Ogółem w ciągu trzech lat zbadano 1064 zwierzęta, od których wyizolowano 56 szczepów należących prawdopodobnie do serotypu *L. grippotyphosa*; jednak dokładne badania serologiczne nie zostały jeszcze ukończone. Ilość wyhodowanych szczepów pokrywa się z ilością dodatnich wyników bakteriologicznych, gdyż wszystkie posiewy udało się utrzymać w stałej hodowli. Obecność leptospir w wymienionych posiewach była stwierdzana w różnych okresach: w 44 przypadkach leptospiry zauważono między 5 a 7 dniem, w 8 między 10 a 15; 2 posiewy były dodatnie 20 i 2 — 28 dnia.

Badania serologiczne 294 surowic bydła i koni, mimo że w otrzymanych wynikach dominuje *L. grippotyphosa*, nie wskazują na zwiększoną możliwość infekcji zwierząt domowych pasących się na terenach irygacyjnych. Uzyskane miana są na ogół niskie, a ilość surowic reagujących dodatnio w porównaniu z ogólnymi badaniami przeprowadzanymi stale przez nasz Zakład w różnych częściach Polski nie odbiega od przeciętnej (Zwierz i współpr., 1953, 1958a, b: Zwierz, 1957; Parnas i współpr., 1958).

W przedstawionych badaniach zwraca uwagę jeden ważny fakt, zasługujący na zestawienie z wynikami dawniejszych prac (np. Chromiński, 1949; Parnas i współpr., 1958; Schueffner i Bohlander, 1942; Skrodzki, 1952; Zwierz, 1957).

Mimo bardzo dużego nosicielstwa wśród drobnych ssaków (tak z terenów nawadnianych wodami ściekowymi jak i z terenów kontrolnych) w roku 1958 nie stwierdzono ani epidemii wśród ludzi, ani epizocji wśród zwierząt. W związku z tym nasuwa się wniosek, że samo nosicielstwo wśród gryzoni nie decyduje jeszcze o wybuchu epidemii czy epizoocji; muszą istnieć zatem jeszcze dodatkowe czynniki, które ułatwiają zarazkowi przedostanie się z drobnych ssaków na ludzi lub zwierzęta domowe.

WNIOSKI

Stopień nosicielstwa, jaki stwierdzono u małych ssaków z terenów nawadnianych wodami ściekowymi, nie był większy (w latach, w których przeprowadzano badania) niż u zwierząt pochodzących z terenów kontrolnych.

Ilość zainfekowanych małych ssaków w poszczególnych latach jest różna; wydaje się, że fakt ten pozostaje w pewnej zależności od niektórych czynników atmosferycznych.

Wyniki badań serologicznych zwierząt domowych pasących się na polach irygacyjnych nie wskazują na istnienie zwiększonej możliwości infekcji.

W otrzymanych wynikach dodatnich, tak serologicznych jak i bakteriologicznych, wyraźnie dominuje serotyp *L. grippotyphosa*.

Jak wynika z dotychczasowych badań nawadnianie pól wodami ściekowymi nie stanowiło w latach 1957-1959 specjalnego niebezpieczeństwa, jeżeli chodzi o możliwość rozprzestrzenienia się leptospiroz.

Serdeczne podziękowanie składamy Okręgowemu Biuru Prognoz Państwowego Instytutu Hydrologiczno-Meteorologicznego we Wrocławiu za udostępnienie nam danych dotyczących temperatury i opadów w latach 1957-1959.

LITERATURA

Chromiński, C., 1949: Gorączka błotna w woj. lubelskim w r. 1948. *Med. Doświad. Mikrobiol*, **3**: 370.

Parnas, J., Dąbrowski, T., Łazuga, K., Koślak, A., Paroszkiewicz, M., 1958: Badanie mikrobiologiczne w kierunku leptospir u małych ssaków i zwierząt domowych w powiecie Tomaszów Lubelski (lata 1956-1957) *Przegl. Epidemiol.* **12**:

Schueffner, W., Bohlander, H., 1942: Schlammfieber in Holland; die Feldmäuse als Träger. *Zentr. Bakter. I, 0*, **148**: 264.

Skrodzki, E., 1952: Spostrzeżenie o roli szczurów jako czynnika epidemiologicznego w żółtaczce zakaźnej. *Med. Dośw. Mikrobiol*, **6**: 291.

Zwierz, J., 1957: Leptospirozy, PZWL Warszawa.

Zwierz, J., Chrzanowski, B., Durlakowa, I., 1953: Badania nad nosicielstwem zarazków choroby błotnej u gryzoni. *Pol. Tyg. Lek.*, **18**: 655.

Zwierz, J., Durlakowa, I., Karmańska, K., Zwierzchowski, J., Łazuga, K., Korczyńska, A., 1958a: Badania fauny w ogniskach epidemii leptospiroz w powiecie Tomaszów Lubelski. *Med. Wet.*, **11**: 647.

Zwierz, J., Karmańska, K., Konarska, D., Wasilewska, E., Scheller, S., 1958b: Badanie fauny z terenów nawadnianych wodami ściekowymi w kierunku nosicielstwa leptospir. *Med. Wet.*, **11**: 658.

Józef Zwierz, Krystyna Karmańska, Danuta Konarska and *Eleonora Wasilewska*

AREA IRRIGATED WITH SEWAGE. ITS HYGIENIC AND SANITARY EVALUATION. VI. LEPTOSPIRA INFECTION IN ANIMALS FROM IRRIGATED AREA

Summary

During the years 1957-1959 775 rodents and other small mammalia from irrigated area and 271 animals from the control, not-irrigated area, were investigated on the presence of *Leptospira* infection. Bacteriological, serological and biological (experimental infection of guinea pigs and hamsters) tests were

made with each of the animals. An animal giving a positive reaction at least in one of the tests was designed as „infected". Correlation between the used tests is illustrated in Fig. 1.

Results are given in Tables I and III. Fraction of infected animals was variable. 42 per cent in 1959 and 5,3 per cent in 1959. The frequency of infection was the same among animals from irrigated area and from the control one. Infection was less frequent only in small rodents from the city area.

It seems that the chief factors influencing the frequency of infection were the climatic conditions, especially the temperature and the amount of fall (compare Tables III and IV).

From all cases of infection 56 strains of *Leptospira* were isolated.

At the same time serological tests for the leptospirosis were made with sera of 290 domestic animals (cattle and horses) from irrigated area. The frequency of positive reactions was not different from the one found in these animals in other parts of the country.

It seems that the irrigation with urban sewage had no influence upon the probability of *Leptospira* infection in rodents and other small mammalia and in cattle and horses living in an irrigated area.

Adres autorów:
Authors' address:

Prof. dr J. Zwierz,
Zakład Badań nad Leptospirozą Instytutu Weterynarii.
Wrocław, ul. Rodakowskiego 6.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1961, 10 : 457 - 468

Zofia Skurska, Marianna Łobodzińska, Tadeusz Kidankiewicz, Zofia Bałtowska i *Henryk Makower.*

BADANIA TERENÓW NAWADNIANYCH ŚCIEKAMI POD WZGLĘDEM HIGIENICZNO-SANITARNYM. VII. BADANIA WIRUSOLOGICZNE ŚCIEKÓW I GRYZONI Z TERENÓW NAWADNIANYCH WODAMI ŚCIEKOWYMI

Z Zakładu Wirusologii Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu

Wpłynęło dnia 15 kwietnia 1961 r.

Streszczenie:

Z małych ssaków odławianych na terenach nawadnianych ściekami wyizolowano pewną ilość szczepów wirusowych, w większości nie dających się pasażować przez czas dłuższy, poza dwoma szczepami Coxsackie. Ze ścieków wyosobniono 3 szczepy Coxsackie i 5 szczepów Adenowirusów.

W dociekaniach epidemiologicznych nad rozprzestrzenieniem wirusów chorobotwórczych dla człowieka często istotną rolę odgrywają sezonowe badania zwierząt domowych i dzikich oraz wód i ścieków. Od pierwszych na szerszą skalę zakrojonych badań tego typu przeprowadzonych przez Garda i współpracowników (Gard, 1940; Paul, Trask i Gard, 1940) upłynęło już wiele lat. Jednak zagadnienie to nie straciło dotąd na aktualności i od czasu do czasu pojawiają się doniesienia dotyczące występowania różnych wirusów w rezerwuarach zwierzęcych czy wodach ściekowych.

Do lepiej zbadanych w tym kierunku należą enterowirusy. Stwierdzono je zarówno w wodach ściekowych jak i kanałach, przy czym wykazano, że w okresach epidemicznych występują one niejednokrotnie w znacznym nasileniu (Clark i współpr., 1951; Mac Callum i współpr., 1952; Melnick i współpr., 1947, 1954a, b; O'Connor i Morris, 1955; Paul i współpr., 1940).

Jest rzeczą możliwą, że wody ściekowe przy większych miastach mogą być źródłem zakażeń wśród drobnych zwierząt żyjących na te-

renie nawadnianym tymi wodami. Istnieje też uzasadnione podejrzenie, że mogą się one stać przyczyną występowania epizootii i zachorowań wśród ludzi.

Ażeby się przekonać czy ewentualność taka istnieje podjęte zostały zespołowe badania bakteriologiczne i wirusologiczne z ramienia Polskiej Akademii Nauk, w których udział wzięły liczne katedry i instytuty. Badania wirusologiczne przeprowadzał Zakład Wirusologii Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu w latach 1958-1960.

Badania te dotyczyły początkowo tylko fauny odłowionej na terenie nawadnianym wodami ściekowymi. Ponieważ wyniki badań w tym okresie były niedostatecznie zadowalające, w następnym roku obok badań drobnych gryzoni przeprowadziliśmy badania wód ściekowych. Sądziliśmy bowiem na podstawie piśmiennictwa, że z tego materiału łatwiej uda się uzyskać szczepy wirusowe.

MATERIAŁ I METODYKA

Badaniom podlegały drobne ssaki żyjące na terenach nawadnianych wodami ściekowymi i tam łowione. Należały do nich: *Microtus arvalis* — nornik zwyczajny, *Sorex araneus* — ryjówka aksamitna, *Apodemus agrarius* — mysz polna, *Apodemus flavicollis* — mysz leśna oraz inne drobne gryzonie dotąd nie zidentyfikowane. Ponadto w r. 1959 badano również wody ściekowe pochodzące z jednego terenu (oznaczonego jako teren I) i obejmujące wodę ze zbiornika wód nie oczyszczonych, osadnika i wody po przejściu przez osadnik.

Ogółem zbadano na obecność zakażenia wirusowego 651 gryzoni i 45 próbek wody ze ścieków.

IZOLACJA WIRUSÓW

Przy badaniu gryzoni jako materiału do badań używano zawiesiny narządów. Przygotowywano mieszaniny w buforze fosforanowym z narządów 3-5 gryzoni, sporządzając osobno zawiesinę mózgów, śledzion oraz kałów. Wyjaławiano antybiotykami dając 500 j. penicyliny + 500 μg streptomycyny na ml i po przeprowadzeniu próby na jałowość każdą z tych zawiesin szczepiono osobną grupę myszy.

Początkowo używano myszy 3-tygodniowych, zakażając je dootrzewnowo i domózgowo; później do zakażeń brano również 24-godzinne noworodki mysie, które szczepiono podskórnie. Po 5 dniach robiono ślepy pasaż z tych samych narządów, co materiał wyjściowy. Jeżeli zwierzęta w ciągu 3 tygodni nie wykazywały zmian chorobowych, uważano doświadczenie za ujemne.

Myszy z porażeniami usypiano, wypreparowywano mięśnie lub narząd, a ich zawiesinę pasażowano dalej. Po drugim pasażu wykonywano miareczkowanie szczepu.

Badania wykonywano również na hodowlach tkankowych. W tym celu szczepiono 72-godzinną hodowlę komórek *HeLa* stosując 0,2 ml badanej zawiesiny. Szczepioną hodowlę obserwowano przez 10 dni. Jeżeli po upływie tego

czasu hodowla nie wykazywała efektu cytopatogenetycznego, materiał traktowano jako ujemny wirusologicznie. W razie wystąpienia zmian degeneracyjnych w hodowli *HeLa*, przeprowadzano następne pasaże i otrzymany szczep miareczkowano.

W celu opracowania wód ściekowych postępowano w sposób następujący: w poszczególnych zbiornikach umieszczano woreczki z gazy, przez które przepływały ścieki przez 7 dni. Po tym czasie gazę wyjmowano, płyn wyciskano do probówki i na każde 100 ml płynu dodawano 0,2 ml 1 M NaOH. Następnie wirowano i do płynu znad osadu dodawano 1 ml surowicy końskiej na 20 ml płynu. Materiał wyjaławiano antybiotykami (500 jednostek penicyliny i 500 µg streptomycyny na 1 ml) i bakteriologicznie jałowe próbki używano do badań wirusologicznych. Dalej postępowano analogicznie, jak z materiałem otrzymanym z gryzoni, szczepiąc go na noworodki mysie i na hodowlę komórek *HeLa*.

ODCZYN NEUTRALIZACJI

Odczyn neutralizacji wykonywano również na hodowlach komórek *HeLa* i na noworodkach mysich.

Neutralizacja wirusa w hodowlach tkankowych. 100 TCD_{50} wirusa mieszano z surowicą odpornościową rozcieńczoną dziesięciokrotnie w stosunku 1 : 1 i pozostawiano na 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Następnie zakażano hodowlę tkankową 0,2 ml mieszaniny wirusa z surowicą. Z hodowli usuwano uprzednio płyn odżywczy i przepłukiwano ją glukozolem. Wiązanie wirusa z komórkami przeprowadzano w temperaturze 37° w ciągu pół godziny, a następnie dodawano płynu odżywczego. Występowanie efektu cytopatogenetycznego sprawdzano w ciągu 10 dni; zazwyczaj występował on między 2 a 5 dniem. Kontrole hodowli komórek *HeLa* nie wykazywały żadnych zmian degeneracyjnych.

Neutralizacja wirusa na noworodkach mysich. Podobnie jak przy izolacji wirusa do odczynu neutralizacji używano myszy 48-godzinnych. Noworodkom wstrzykiwano podskórnie jedną dawkę wirusa zawierającą 100 DL_{50} z surowicą odpornościową rozcieńczoną 1/10. Szczepiono 3-4 noworodki i obserwowano je aż do wystąpienia objawów chorobowych, a w wypadku braku objawów chorobowych obserwowano je w ciągu 14 dni.

WYNIKI

W omawianym okresie wykonano 2569 badań, obejmując nimi materiał 651 gryzoni i 45 próbek wód ściekowych. Czasami opracowywanie niektórych materiałów przeprowadzano dwukrotnie. Miało to miejsce przede wszystkim w początkowych pasażach, gdy uzyskiwano efekt cytopatogenetyczny w hodowli tkankowej lub gdy zwierzęta padały. Z chwilą urywania się przeszczepialności szczepów próbowaliśmy wracać do materiału wyjściowego i w ten sposób zwiększyć możliwość ich izolacji. Zabieg ten jednak nie doprowadzał zazwyczaj do celu. Ilość wyizolowanych szczepów okazała się nieproporcjonalnie mała w porównaniu do ogromu pracy jaką wykonano. Wyniki uzyskane z wód ściekowych znajdują się w dalszej części pracy. Wyniki badania małych gryzoni podaje tabela I.

Szczepy z roku 1958 i niektóre ze szczepów wyodrębnionych w roku 1959 nie zostały zidentyfikowane. Utrzymywały się one tylko w kilku pierwszych pasażach, zarówno przy pasażowaniu przez myszy, ich noworodki na drodze podskórnej, dootrzewnowej czy domózgowej, jak i w hodowli tkankowej. Zazwyczaj traciły one zjadliwość dla myszy lub ich noworodków już po 2-5 pasażach. Podobnie w hodowli komórek *HeLa* po kilku pasażach urywał się efekt cytopatogenetyczny i to niezależnie od rozcieńczeń, jakich używano przy pa-

Tabela 1

Izolacja szczepów wirusowych z drobnych gryzoni. Lato 1958 i 1959
Recovery of viruses from small mammalia. The summer 1958 and 1959

Okres Period	Ilość zwierząt Number of animals	Ilość badań Number of experiments	Materiał badany Material examined: Mózg Brain	Kał Excrementa	Śledziona i wątroba Spleen and liver	Liczba wyizolowanych szczepów Number of recovered virus strains	Sposób izolacji Method of isolation
1958	300	592	6/300	8/292	0	14	izolacje uzyskane przez pasaże na myszkach in mouse passages
1959	351	769	0/67	3/351	4/351	7	
1958	230	460	6/230	7/230	0	13	w hodowli komórek *HeLa* In tissue cultures (*HeLa* cells)
1959	351	738	0/67	12/351	11/320	23	

sażowaniu szczepów.

Uzyskane szczepy wirusowe pochodziły z dwóch gatunków zwierząt: *Apodemus agrarius* i *Microtus arvalis*.

Dwa szczepy Coxsackie wyizolowane ze śledziony mysz polnych (*Apodemus agrarius*) na hodowli komórek *HeLa* były pierwotnie mało zjadliwe dla noworodków mysich. Dopiero po kilku pasażach udało się zaadaptować je do nich, wówczas gdy miano zakaźne podniosło się dostatecznie (10^{-5} $TCID_{50}$).

Próba wyizolowania szczepu z materiału wyjściowego (z zawiesiny śledziony) bezpośrednio przez szczepienie podskórne noworodków mysich udała się tylko w jednym z dwu przypadków (szczep *XIII* Cox-

sackie). Zawiesina śledziony zawierająca wirus (szczep oznaczony jako *XIV* w hodowli tkankowej) była niechorobotwórcza dla noworodków mysich; zakażenie noworodków udało się dopiero po namnożeniu wirusa w hodowli komórek *HeLa*. Równolegle przeprowadzone próby izolacji wirusa z kału tych zwierząt dały wyniki ujemne.

Wyizolowane szczepy po dostosowaniu do noworodków mysich wywoływały u nich typowe objawy porażenia kończyn. Miano zakaźne dla myszy pozostało jednak nawet po adaptacji szczepów niższe dla myszy niż dla komórek *HeLa*.

Dla szczepu *XIII* $TCID_{50}$ wynosiło 10^{-6}, ID_{50} dla noworodków mysich — 10^{-4}. Dla szczepu *XIV* $TCID_{50}$ wynosiło 10^{-7}, ID_{50} dla noworodków myszy — 10^{-5}.

Typowanie wyizolowanych szczepów przeprowadzano odczynem neutralizacyjnym z surowicami odpornościowymi dla wirusów Coxsackie grupy *A* i *B*. Wyizolowane z gryzoni szczepy *13/N/59* i *14/N/59* okazały się szczepami Coxsackie typu B_3 (Tabela II).

Tabela II

Określanie wyizolowanych szczepów z gryzoni za pomocą odczynu neutralizacji z surowicami odpornościowymi anty-Coxsackie na noworodkach mysich
Identification of viruses isolated from rodents (neutralization test with anti-Coxsackie sera in new-born mice)

Szczep 100 LD_{50} Strain 100 LD_{50}	Surowice odpornościowe rozcieńczone 1/10 Immune sera, dilution 1/10						Kontrola szczepu Strain control
	A_1	A_2	A_4	B_2	B_3	B_4	
13/N/59	3/3	3/3	4/4	3/3	0/7	3/3	6/6
14/N/59	6/6	3/3	3/3	3/3	0/7	4/4	3/3

Liczby w liczniku oznaczają ilość padłych noworodków mysich, a w mianowniku — ilość szczepionych. W kontroli używano 100 LD_{50} szczepu bez surowicy odpornościowej.
Numerator — number of infected mice, killed by the virus; denominator — 100 LD_{50} of tested strain without serum was given per mouse.

Z 45 próbek ścieków nie wyizolowano przez szczepienie noworodków mysich ani jednego pasażującego się szczepu. Z tego samego materiału na hodowli komórek *HeLa* uzyskano 9 szczepów (Tabela III). 4 szczepy ze ścieków pochodziły ze zbiornika, 4 z osadnika i 1 szczep ze ścieków po przejściu przez osadnik. W tabeli III uwzględniono czas, w którym pobierano próbki wody służące do badań nad izolacją szczepów wirusowych.

Badania wód ściekowych w październiku i listopadzie 1959 roku dały wyniki ujemne. W tabeli III zwraca uwagę fakt, że wszystkie szczepy adenowirusów izolowane były w ciągu sierpnia tego roku, przy czym nie izolowano ich z wody po przejściu przez osadnik.

Tabela III

Izolacja wirusów z ścieków z Stacji Oczyszczania na Osobowicach lato 1959. Ilość badań — 45.

Recovery of Adenoviruses and Coxsackie strains in Osobowice Sewage Purification Station during the summer 1959. Number of experiments — 45

Nr badania No of experiment	Data pobrania materiału Date of sample collection	Miejsce pobrania materiału Sample collected from: zbiornik storage tank	osadnik sedimentation tank	ścieki po przejściu przez osadnik effluent from sedimentation tank
1	21 VI	0	0	0
2	7 VII	+	+	0
3	28 VII	0	0	0
4	3 VIII	+	0	0
5	11 VIII	×	×	0
6	18 VIII	×	×	0
7	25 VIII	0	×	0
8	1 IX	0	0	0
9	8 IX	0	0	+
10	15 IX	0	0	0
11	22 IX	0	0	0

\+ = szczepy Coxsackie
× = szczepy adenowirusów

Po trzecim pasażu na hodowli tkankowej wszystkie szczepy przeszczepiano na noworodki mysie. 3 szczepy były chorobotwórcze dla noworodków mysich, wywołując u nich charakterystyczne objawy porażenia kończyn. Objawy te występowały najczęściej po 72 godzinach od czasu zakażenia.

Miana zakaźne tych szczepów dla noworodków mysich wahały się od 10^{-4} do 10^{-5}. Miano tych szczepów bezpośrednio po wyodrębnieniu na komórkach *HeLa* było bardzo niskie. $TCID_{50}$ wynosiło w tym czasie 10^{-3}. Szczepy chorobotwórcze dla myszy określono następnie w odczynie neutralizującym na noworodkach mysich z surowicami odpornościowymi anty-Coxsackie.

Wyizolowane ze ścieków szczepy *: *4a/S/59*, *2b/S/59*, *9c/S/59* okazały się szczepami Coxsackie typu B_3 (tabela IV).

* a — szczep izolowany z zbiornika, b — szczep izolowany z osadnika, c — szczep izolowany ze ścieków po przejściu przez osadnik.

Pozostałe szczepy izolowane ze ścieków, niechorobotwórcze dla noworodków mysich, określono w odczynie neutralizacyjnym na hodowli komórek *HeLa* z surowicami odpornościowymi przeciwko wirusom Coxsackie, choroby Heinego-Medin y i adenowirusom (tabela V).

Tabela IV

Określanie wyizolowanych szczepów ze ścieków za pomocą odczynu neutralizacji z surowicami odpornościowymi anty-Coxsackie na noworodkach mysich
Identification of viruses isolated from sewage (neutralization test with anti-Coxsackie sera in new-born mice)

Szczep Strain	Surowice odpornościowe rozcieńczone 1:10 Immune sera, dilution 1:10						Kontrola szczepu Strain control
	A_1	A_2	A_4	B_2	B_3	B_4	
4a/S/59	4/4	3/3	3/3	3/3	0 4	4/4	3/3
2b/S/59	3/3	3/3	4/4	3,3	0 4	3 3	3 3
9c/S/59	3/3	4/4	3 3	3/3	0 3	3 3	3 3

Dawka wirusa — *100 LD_{50}* Infecting dosis — *100 LD_{50}*. Patrz uwagi do tabl. II. See remarks to table II.

Jak wynika z tabeli V, przy użyciu niskich rozcieńczeń surowic odpornościowych szczepy *5b/S/59* oraz szczep *6b/S/59* zobojętniane są zarówno przez surowicę dla typy *1* jak i *17*. Natomiast nie są zupełnie neutralizowane przez surowice antypoliomyelityczne ani anty-Coxsackie.

Dalsze badania w obrębie grupy *APC* przeprowadzone przy pomocy bardziej rozcieńczonych surowic wykazały, że izolowane przez nas szczepy należą do typu adenowirusów *17*.

Tabela VI zestawia krzyżowe reakcje odczynu zobojętniania badanych szczepów z surowicami odpornościowymi króliczymi. Widoczna jest słabo zaznaczona krzyżowa neutralizacja surowicy dla typu *1* z trzema szczepami. Surowica odpornościowa dla typu *3* daje krzyżową reakcję do miana 1/10 tylko z jednym z badanych szczepów, a mianowicie *5b/S/59*. Szczep ten reaguje również z surowicami dla typu *1* i *9*, ale wykazuje przy tym niskie miano.

Stwierdziwszy przynależność badanych szczepów do typu *17* adenowirusów, kontrolowaliśmy ich zachowanie się w odczynie hemaglutynacyjnym z krwinkami kury, myszy, świnki morskiej, szczura i ludzkimi. Według R o s e n a (1958) zachowanie się szczepów adenowirusów w stosunku do krwinek niektórych rodzajów zwierząt jest cechą tak stałą, że można, opierając się na odczynie hemaglutynacyjnym, identyfikować szczepy. Jest to więc jeszcze jedna z możliwości typowania wirusów, z której skorzystaliśmy dla potwierdzenia wyni-

Tabela V

Określanie wyizolowanych szczepów ze ścieków za pomocą odczynu neutralizacji z surowicami odpornościowymi przeciwko wirusom Coxsackie, adenowirusom i wirusom porażenia dziecięcego na hodowli tkankowej komórek *HeLa*

Identification of viruses isolated from sewage (neutralization test with anti-Coxsackie, anti-Adenovirus and anti-polio sera in *HeLa* cell tissue cultures)

Szczep Strain 100 TCD_{50}	Surowice odpornościowe — Immune sera																
	poliomyelitis			Coxsackie					adenowirusy								
	typ			typ					typ								
	I	*II*	*III*	A_2	B_1	B_2	B_3	B_5	1	2	3	4	6	7	9	10	17
5b/S/59	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	4/4	3/3	3/3	1/3	3/3	0/3	3/3	3/3	3/3	0/3	3/3	0/3
6a/S/59	3/3	3/3	3/3	4/4	3/3	3/3	3/3	3/3	3/6	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	0/3
6b/S/59	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	0/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	0/3
7b/S/59	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	0/3

Liczby w liczniku oznaczają ilość zdegenerowanych hodowli, a w mianowniku — ilość zakażonych.
Denominator — number of infected cultures, numerator — number of degenerating cultures.

Tabela VI

Miano przeciwciał surowic neutralizujących w stosunku do adenowirusów izolowanych ze ścieków
Titer of immune sera neutralising Adenoviruses isolated from sewage

Szczep wirusa Strain of virus	Surowice odpornościowe dla typu Immune sera specific for type				
	1	*3*	*9*	*2, 4, 6, 7, 10*	*17*
5b/S/59	10	10	10	0	50
6b/S/59	10	0	0	0	100
6a/S/59	10	0	0	0	50
7b/S/59	0	0	0	0	50

Tabela VII

Miano hemaglutynacji szczepów adenowirusów z różnymi krwinkami
Haemagglutination titer of Adenoviruses strains with red blood cells of various origin

Szczep Strain	Rodzaj erytrocytów Red blood cells from		
	ludzkie, kurze, świnki morskiej man, hen, guinea pig	mysie mouse	szczurze rat
5b/S/59	0	32	128
6b/S/59	0	16	64
6a/S/59	0	16	16
7b/S/59	0	74	64

ków uzyskanych przez typowanie szczepów odczynem neutralizacji. Zachowanie się wyizolowanych szczepów w odczynie hemaglutynacyjnym przedstawia tabela VII.

Jak wynika z tej tabeli, izolowane ze ścieków szczepy adenowirusów dawały aglutynację tylko z krwinkami szczura i myszy, co odpowiada zachowaniu się adenowirusów typu *17*. Uzyskane miana hemaglutynacyjne były niewysokie i wahały się od 1/16 do 1/128.

Badania niniejsze wykazały, że tylko w bardzo niewielkim odsetku przypadków udaje się izolować szczepy z materiału pochodzącego od drobnych gryzoni, lub z wód ściekowych. Jednakże szczepy z wód ściekowych udało się łatwiej utrzymać w dalszych pasażach i doprowadzić do ich określenia. Szczepy izolowane z gryzoni najczęściej urywały się po kilku pasażach.

Wyizolowane przez nas szczepy Coxsackie należą do typu B_3, a niektóre szczepy tego typu nie mają zdolności do rozmnażania się w organizmie noworodków mysich. Szczepy te udało się wyizolować tylko z pasaży na komórkach *HeLa*.

Zwraca uwagę nieobecność szczepów poliomyelitycznych w wodach ściekowych, ale w r. 1959 nie było we Wrocławiu masowych zachorowań na polio, a w r. 1958 nie badaliśmy w tym kierunku wód ściekowych. Ponadto użycie przez nas hodowli komórek *HeLa* do izolacji szczepów enterowirusów z góry ograniczało nasze możliwości.

Tak więc na bardzo dużą ilość wykonanych badań uzyskano jedynie skromny odsetek wyników dodatnich. Hodowle tkankowe pozwoliły w większym stopniu uzyskać szczepy pozwalające pasażować się dowolną ilość razy i zaadaptować do nowego gospodarza, aniżeli to miało miejsce przy szczepieniu myszy. Podczas gdy u myszy białych i ich noworodków odsetek początkowo wyizolowanych szczepów był mniej więcej taki sam jak w hodowli komórek *HeLa*, to w tych ostatnich o wiele częściej udało się otrzymać szczepy zaadaptowane do tkanki, które nadawały się do typowania. Niestety nie dysponowaliśmy wówczas hodowlą komórek nerki małpiej, co by pozwoliło na pewno z tego samego materiału uzyskać o wiele lepsze wyniki.

Na 9 szczepów izolowanych w r. 1959 z wód ściekowych 6 okazało się szczepami adenowirusów, przy czym wszystkie one izolowane były w sierpniu tego roku. Przypuszczalnie w tym czasie przebiegała klinicznie nie zauważona, lub wirusologicznie nie opracowana infekcja, wywołana przez tę grupę wirusów. Z drugiej strony można by założyć, że w omawianym czasie pojawiła się infekcja wśród zwierząt przebywających na tym terenie. Przypuszczenie to mogłoby być poparte obserwacjami Hartleya (1960), który donosi o szczepie adenowirusów izolowanym z myszy.

Badania drobnych ssaków poławianych na terenach nawadnianych wodami ściekowymi, nie wykazały jednak obecności szczepów homologicznych wśród gryzoni. Tak więc przypuszczać należy, że raczej pierwotna koncepcja jest słuszna i że szczepy te są pochodzenia ludzkiego. Jak wykazały badania Kibrich i współpr. (1955) adenowirusy można łatwo izolować z kału ludzi. Sabin izolował szczep adenowirusów z kału małpy (cyt. wg Rowe i współpr., 1956). Jak dotąd jednak w dostępnym nam piśmiennictwie nie znaleźliśmy wzmianki o występowaniu adenowirusów w wodach ściekowych. Jest to więc pierwsze doniesienie o izolacji tej grupy wirusów z wód ściekowych.

LITERATURA

Clark, E. M., Knowles, D. S., Shimada, F. T., Rhodes, A. J., Ritchie, R. C., Donohue, W. L., 1951: Coxsackie virus in urban sewage. *Cand. J. Publ. Health,* **42**: 103.

Gard, S., 1940: Method for detecting poliomyelitis virus in sewage and stools. *J. Exp. Med.,* **71**: 779.

Hartley, J. W., 1960: A new mouse virus apparently related to the Adenovirus group. *Virology,* **11**: 645.

Kibrick, S., Enders, J. F., Robbins, F. C., 1955: *J. Immunol,* **75**: 39.

Mac Callum, F. O., Cockburn, W. C., Smithard, E. H. R., Wright, S. L., 1952: The use of gause swabs for the detection of poliomyelitis virus in sewers. In Poliomyelitis: papers and discusions presented at the second International Poliomyelitis Conference Lippincott, Philadelphia: 484.

Melnick, J. L., 1947: Poliomyelitis virus in urban sewage in epidemic and in nonepidemic times. *Amer. J. Hyg.,* **45**: 240.

Melnick, J. L., Emmons, J., Coffey, J. H., Schoof, H. F., 1954a: Seasonal distribution of Coxsackie viruses in urban sewage and flies. *Amer. J. Hyg.,* **59**: 164.

Melnick, J. L., Emmons, J., Opton, E. M., Coffey, J. H., 1954b: Seasonal distribution of Coxsackie viruses in urban sewage and flies. *Amer. J. Hyg.,* **59**: 185.

O'Connor, J. R., Morris, J. A., 1955: Recovery of Texas-1 Coxsackie virus from blood of wild rabbit and from sewage contaminating rabbits' feeding ground, *Amer. J. Hyg.,* **61**: 314.

Paul, J. R., Trask, J. D., Gard, S., 1950: Poliomyelitis virus in urban sewage. *J. exp. Med.,* **71**: 765.

Rosen, L., 1958: *Virology,* **5**: 574.

Sabin, A. B., cytowane za Rowe, W. P., Hartley, J. W., Huebner, R. L., 1956: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.,* **91**: *260.*

Zofia Skurska, Marianna Łobozińska, Tadeusz Kidankiewicz, Zofia Bałtowska and *Henryk Makower*

AREA IRRIGATED WITH SEWAGE. ITS HYGIENIC AND SANITARY EVALUATION. VII. VIROLOGICAL STUDY OF SEWAGE AND OF RODENTS FROM IRRIGATED AREA

Summary

During the years 1958-1960 rodents from area irrigated with urban sewage and the sewage were examined for presence of viruses pathogenic for men.

Virus strains isolated from rodents lost easily their infectivity for new-born mice and for *HeLa* cells even after few passages. Due to the unstability of these viruses only two strains from rodents could be identified. Both strains, Coxsackie virus type B_3, were isolated from the spleen of *Apodemus agrarius* — one in mouse passage and in *HeLa* cells culture, the second one only in *HeLa* cells culture. This second strain was able to infect experimental new-born mice after relatively long period of adaptation in a tissue culture (see Tables I and II).

More virus strains were recovered from the sewage (from the storage tank, sedimentation tank and from the effluent). Three strains belonged to Coxsackie

type B_3, five — to Adenovirus type 17. Identification was conducted by neutralization test in new-born mice and in *HeLa* cell cultures with specific immune sera, and for Adenoviruses, additionally by haemagglutination test with erythrocytes of various origin (Tables III-VII).

To the knowledge of the authors it is the first case of isolation of Adenoviruses from sewage.

Adres autorów:
Authors' address:

Prof. Dr Z. Skurska i Prof. Dr H. Makower,
Zakład Wirusologii Instytutu Immunologii
i Terapii Doświadczalnej PAN im. L. Hirszfelda,
Wrocław, ul. Chałubińskiego 4

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1961, 10 : 469 - 472

Natalia Balicka i *Jerzy Sobieszczański*

BADANIA TERENÓW NAWADNIANYCH ŚCIEKAMI POD WZGLĘDEM HIGIENICZNO-SANITARNYM. VIII. WPŁYW KORZENI NIEKTÓRYCH ROŚLIN I ICH MIKROFLORY KORZENIOWEJ NA *ESCHERICHIA COLI*

Z Katedry Mikrobiologii Rolnej Wyższej Szkoły Rolniczej we Wrocławiu

Wpłynęło dnia 10 marca 1961 r.

Streszczenie

Korzenie roślin motylkowych, żyta i niektórych traw (lecz nie warzyw) hamują wzrost *E. coli*. Efekt jest tu wywołany nie przez wydaliny korzeniowe lecz przez antagonistyczne oddziaływanie mikroflory rizosfery tych roślin.

W poprzednim doniesieniu (Balicka i Sobieszczański, 1957) podano obserwacje dotyczące stosunku systemu korzeniowego niektórych roślin wraz z ich mikroflorą korzeniową do *Escherichia coli*. Niniejsza praca stanowi dalszy ciąg tych badań. Celem jej było stwierdzenie czy hamowanie wzrostu *E. coli* dookoła korzeni niektórych roślin było spowodowane działaniem samych korzeni, czy też uzależnione od obecności na ich powierzchni drobnoustrojów antagonistycznych.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Do doświadczeń wybrano kilka różnych roślin motylkowych i traw uprawnych, warzyw i chwastów. Większość korzonków pochodziła od roślin młodych, kilkumiesięcznych. Niektóre trawy (kupkówka, tymotka) były jednoroczne. Korzonki ucinano, usuwano przyczepione cząstki gleby, płukano w sterylnej wodzie i po osuszeniu układano na pożywce agarowej z bulionem i glikozą, na powierzchni której rozprowadzono uprzednio zawiesinę *E. coli*. Szczep wyizolowano ze ścieku miejskiego (typ jelitowy).

Po 24-godzinnej inkubacji w 37°, obserwowano wzrost *E. coli* na płytkach i dookoła korzeni roślin.

Tabela I

Strefy zahamowania wzrostu *E. coli* dookoła korzeni niektórych roślin
Inhibition of *E. coli* growth by roots of some plants

Nazwa rośliny Plant	Wiek Age	Szerokość strefy zahamowania wzrostu *E. coli* dookoła korzeni (mm) Inhibition zone around the roots (mm)
Groch — Peas	2 miesiące	1,5
Łubin — Lupine	2 miesiące	2,0
Koniczyna czerwona — Red clover	2 miesiące	2,0
Wyka — Vetch	2 miesiące	1,0 — 1,5
Lucerna — Alfalfa	2 miesiące	2,0
Żyto — Rye	2 miesiące	1,0
Owies — Oats	10 dni	0
Tymotka — Thimothy grass	2 miesiące	±
Tymotka — Thimothy grass	1 roczna	1,0
Wiechlina łąkowa — Meadow grass	4 miesiące	1,0
Gorczyca — White mustard	10 dni	<1,0
Sałata — Salad	15 dni	0
Szpinak — Spinage	15 dni	0
Kapusta — Cabbage	15 dni	0,5
Żółtlica pospolita — Kew-weed	2 miesiące	0,5
Gwiazdnica średnia — Chickweed	2 miesiące	1,0

Dookoła korzeni roślin motylkowych tworzyły się stale strefy zahamowania wzrostu *E. coli*. Kilka roślin trawiastych jedno- i wieloletnich dało wyniki zmienne: wyraźne strefy zahamowania wystąpiły dookoła korzeni żyta, brak zahamowania w wypadku owsa. Na uwagę zasługuje zmienny wpływ korzeni tymotki na *E. coli*, zależny od ich wieku. Wyniki te (fot. 1, 2) były w większości przypadków zgodne z uzyskanymi poprzednio (Balicka i Sobieszczański, 1957)*.

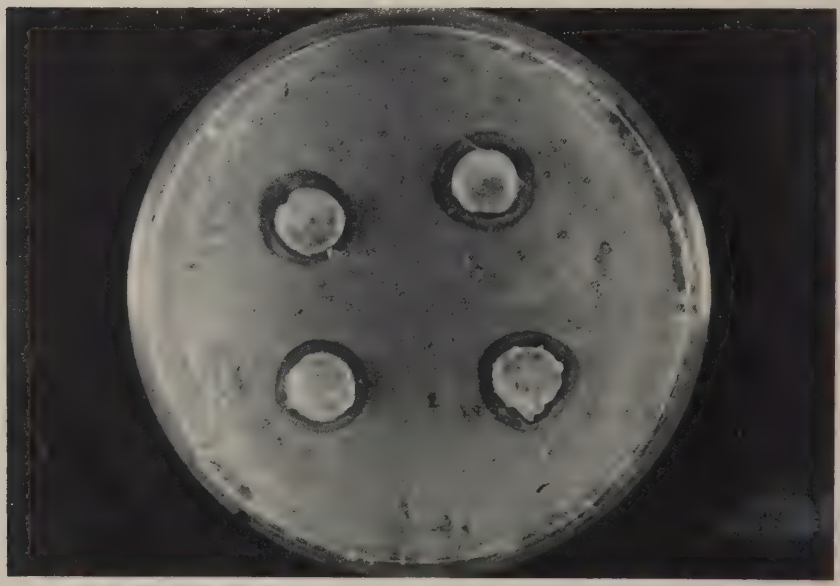
W celu wyjaśnienia czy rozwój *E. coli* jest hamowany przez wydzieliny samego korzenia, czy przez mikroflorę korzeniową, nasiona roślin wysterylizowano, skiełkowano sterylnie na podłożu agarowym i opryskano zawiesiną *E. coli*. W żadnym przypadku nie zauważono stref zahamowania. Wskazuje to, że przyczyną tego zjawiska wokół korzeni niesterylnych była obecność drobnoustrojów korzeniowych, antagonistycznych w stosunku do *E. coli*. W celu sprawdzenia wysiewano zmywy z korzeni poszczególnych roślin na bulion - agar z glikozą — i izolowano wszystkie pojawiające się kolonie bakterii. Ilość wyizolowanych szczepów nie była duża: zależnie od rośliny wynosiła 7-14. Większość z nich stanowiły pałeczki nieprzetrwalnikujące, bliżej przez nas nie identyfikowane.

* Balicka, N., Sobieszczański, K., 1957: Wpływ gleby na *Escherichia coli* wprowadzone ze ściekiem. *Acta Microbiol. Polon.*, **6**: 289.

Fot. 1. Strefy zahamowania wzrostu *E. coli* dookoła korzeni wyki

Fot. 2. Strefy zahamowania wzrostu *E. coli* dookoła korzeni gorczycy
Phot. 1 and 2 — Inhibition of *E. coli* growth around the roots of vetch (phot. 1) and of white mustard (phot. 2)

Fot. 3. Strefa zahamowania wzrostu *E. coli* wywołane przez szczep Nr *12* z rizosfery żyta — częściowo zarośnięte przez Nr *1*



Fot. 4. Strefy zahamowania wzrostu *E. coli* wywołane przez szczep Nr 7 z rizosfery żyta — wzrost wtórny *E. coli*

Phot. 3 and 4 — Inhibition zones of *E. coli* growth by strains No. 12 and No. 7 (from the rhizosphere of rye)

Po uzyskaniu technicznie czystych kultur, badano stosunek każdej z nich do *E. coli*, układając krążki agarowe pokryte dwu- lub trzydniowym wzrostem na płytkę zasianą uprzednio *E. coli*. Wyniki przedstawia tabela II oraz fot. 3 i 4.

Tabela II

Stosunek szczepów bakterii wyizolowanych z rizosfery roślin do *E. coli*
Antagonistic effect on *E. coli* of bacteria isolated from rhizosphere of some plants

Nazwa rośliny Plant	Procent szczepów Per cent of bacterial strains		
	stałe strefy zahamowania wzrostu *E. coli* Inhibition zones of *E. coli* growth	brak zahamowania no inhibition	strefy zahamowania przerastające wtórnym wzrostem *E. coli* Inhibition zones overgrown subsequently with secondary *E. coli* growth
Koniczyna — Clover	49	16	35
Lucerna — Alfalfa	50	50	0
Łubin — Lupine	15	79	15
Wyka — Vetch	22	73	5
Żyto — Rye	43	36	21
Kupkówka — Orchard grass	24	76	0
Tymotka — Thimothy grass	20	80	0
Rajgras włoski — Italian grass	18	82	0
Gorczyca — White mustard	9	91	0
Gwiezdnica — Chickweed	16	84	0
Żółtlica — Kew-weed	12	88	0

Stosunkowo najwięcej bakterii zdolnych do hamowania rozwoju *E. coli* wystąpiło w rizosferze żyta, koniczyny, lucerny, bardzo mało — żółtlicy, gorczycy.

Następny etap pracy stanowiły obserwacje w warunkach glebowych. W tym celu wazoniki o pojemności 100 cm^3 napełniono glebą (gleba ogrodowa i piasek w stosunku 1 : 3) i podlano zawiesiną czystych kultur kilku wybranych bakterii koniczyny i żyta. Wybrano te bakterie, które hamowały rozwój *E. coli* oraz dla porównania — nie hamujące.

Kontrolę wysokości miana *coli* w glebie przeprowadzano co tydzień na pożywce Buliła. Miano *coli* utrzymywało się w ciągu pierwszego miesiąca na poziomie 10^{-9}-10^{-10}, następnie zaczęło spadać jednakowo we wszystkich wazonikach. Po 2 miesiącach osiągnęło poziom typowy

dla gleby kontrolnej, podlewanej tylko wodą, 10^{-3}. Sprawdzenie tych wyników, ewentualnie zbadanie przyczyny nieskuteczności szczepienia gleby kulturą bakterii aktywnych w stosunku do *E. coli*, stanowi cel dalszej pracy.

Spośród zbadanych korzeni roślin najsilniej hamują *E. coli* rośliny motylkowe, następnie trawy; warzywa są zupełnie nieaktywne.

Te same korzenie pozbawione towarzyszącej im mikroflory (sterylne) nie wywierają działania hamującego. Część bakterii wyizolowanych z rizosfery roślin posiada własności antagonistyczne w stosunku do *E. coli*. Ilość takich szczepów u różnych roślin nie jest jednakowa. Najwięcej wyizolowano ich z rizosfery koniczyny, lucerny i żyta.

Natalia Balicka and *Jerzy Sobieszczański*

AREA IRRIGATED WITH SEWAGE. ITS HYGIENIC AND SANITARY EVALUATION. VIII. EFFECT OF ROOTS OF SOME CROP PLANTS AND THEIR RHIZOSPHERE MICROFLORA ON *ESCHERICHIA COLI*

Summary

Its was shown that roots of many plants, especially leguminous (clover and alfalfa) and rye, inhibited strongly growth of *Escherichia coli* in laboratory cultures. Roots of oats and some cultivable grasses and of all vegetable plants had only small effect on growth of *E. coli*.

The bacteriostatic activity of examined roots was destroyed by sterilisation of their surface, and was dependent on the presence of specific rhizosphere microflora. Active, antagonistic for *E. coli* strains of bacteria were isolated from rhizosphere of the roots. The most numerous were such strains in the rhizosphere of clover, alfalfa and rye.

Adres autorów:
Authors' address:

Doc. dr N. Balicka,
Zakład Mikrobiologii Rolnej, WSR,
Wrocław, ul. Norwida 29

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1961, 10 : 473 - 478

Józef Zwierz

BADANIA TERENÓW NAWADNIANYCH WODAMI ŚCIEKOWYMI POD WZGLĘDEM HIGIENICZNO-SANITARNYM

OGÓLNA DYSKUSJA

AREA IRRIGATED WITH SEWAGE. ITS HYGIENIC AND SANITARY EVALUATION. GENERAL DISCUSSION

Z Zakładu Badań nad Leptospirozą Instytutu Weterynarii we Wrocławiu

Badania prowadzono w ciągu trzech lat (1957-1959) w kierunku bakteriologicznym, wirusologicznym, parazytologicznym oraz określano stan zdrowotny zwierząt domowych tych terenów; jednocześnie przeprowadzano badania na terenach kontrolnych. Wyniki badań bakteriologicznych przedstawiają się następująco:

1. Badano drobne ssaki, ścieki w osadnikach i wody ściekowe na obecność prątków gruźlicy. Stwierdzono sześciokrotnie w próbkach ścieków surowych obecność prątków gruźlicy zjadliwych dla świnek morskich, trzykrotnie w próbkach ścieków wypływających z osadnika, natomiast nie stwierdzono obecności prątków zjadliwych w wodzie wypływającej drenami z pól nawadnianych ściekami oraz w wodzie rzecznej. Stwierdzenie prątków w ściekach surowych oraz w ściekach wypływających z osadnika było do przewidzenia, natomiast brak prątków w wodzie wypływającej drenami z pól nawadnianych ściekami wskazywałby, że gleba spełnia w pewnym stopniu rolę filtru. Wyniki badań Ogielskiego i Zawadzkiego sugerują, że tereny nawadniane wodami ściekowymi nie przedstawiają większego niebezpieczeństwa dla zwierząt pasących się na tych terenach lub karmionych zebraną tam paszą. Bardzo ważny argument co do sugestii wyżej wymienionych autorów przedstawił na zebraniu sprawozdawczym, dotyczącym badań ścieków, Sobiech. Sobiech ma pod swoją obserwacją od paru lat oborę krów wolną od gruźlicy. Krowy z tej obory pasą się na terenach nawadnianych wodami ściekowymi i są karmione paszą pochodzącą z tych terenów. Krowy te przez kilka lat były wolne od

gruźlicy, z wyjątkiem ostatniego roku, w którym jedna krowa zakaziła się gruźlicą. Badania epizoocjologiczne wykazały, że krowa ta zaraziła się pijąc wodę z kanału przebiegającego na polach irygacyjnych. Infekcja nastąpiła w okresie awarii w osadnikach, gdy ścieki łatwo przedostawały się do rowów w stanie surowym. Dane te nie pozwalają zatem wykluczyć możliwości zarażenia bydła pasącego się na łąkach irygowanych. Przyjąć jednak należy, że zdarza się to bardzo rzadko, gdyż w czasie kilkuletniej obserwacji obory miał miejsce tylko jeden podobny przypadek.

Badania małych ssaków, odławianych na tych terenach dały tylko w 1 przypadku wynik dodatni (150 badanych). Wyizolowano z narządów nornika zwyczajnego prątki, określone jako typ ptasi. Szczep ten okazał się zjadliwy dla świnek morskich i kur. Obecność prątków gruźlicy typu ptasiego w środowisku, w którym przebywają zwierzęta domowe stwarza możliwość zakażenia i zachorowania tych zwierząt. Obecności prątków gruźlicy typu ptasiego nie można jednak z całą pewnością powiązać z nawadnianiem pól wodami ściekowymi. Biorąc pod uwagę wyniki badań Ogielskiego i Zawadzkiego oraz Fertiga i obserwacje Sobiecha nad oborą wolną od gruźlicy, należy sądzić, że pola nawadniane nie przedstawiają większego niebezpieczeństwa dla zwierząt domowych i dla ludzi.

2. Badania nad nosicielstwem salmonel i shigel były prowadzone przez trzy lata. W 1957 roku prowadzono je w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Hirszfelda. Wyniki badań były ujemne. W następnych latach kontynuowano badania w WZHW we Wrocławiu. W 1958 roku wyizolowano dwukrotnie pałeczkę tyfusu mysiego (*Salmonela typhimurium*) z organów wewnętrznych nornika i myszy polnej. W 1959 roku wyizolowano z organów wewnętrznych nornicy rudej pałeczkę *S. dublin*. Nornica pochodziła z terenów kontrolnych. Na 544 badanych gryzoni nie udało się wyizolować ani w jednym przypadku pałeczki z rodzaju *Shigella*. Autor dochodzi do wniosku, że gryzonie, pochodzące zarówno z terenów nawadnianych, jak i kontrolnych, są w minimalnym stopniu zarażone pałeczkami paradurowymi. Wyniki tych badań pozwalają sądzić, że gryzonie żyjące na terenach nawadnianych nie przedstawiają niebezpieczeństwa zakażenia się ludzi i zwierząt pałeczkami *Salmonella* i *Shigella*. Oprócz tego autor zbadał 91 sztuk gryzoni, z których 52 pochodziło z terenów nawadnianych wodami ściekowymi, a 39 z terenów kontrolnych, na obecność pałeczek z rodzaju *Brucella* z wynikiem ujemnym.

3. Badania drobnych ssaków pochodzących z terenów nawadnianych wodami ściekowymi w kierunku nosicielstwa leptospir przeprowadzono w trzech kolejnych latach: 1957, 1958, 1959. Wyniki otrzymane w poszczególnych latach różniły się między sobą w sposób za-

sadniczy. W 1957 roku dodatnio reagujących gryzoni było około 14,04% w 1958 roku reagowało dodatnio 42,02%, a w roku 1959 zaledwie 5,30%. W 1958 roku i w 1959 roku badano też jako kontrolne drobne ssaki pochodzące z terenów nienawadnianych. Różnica między wynikami z terenów badanych a terenów kontrolnych była znikoma, przy czym na terenach kontrolnych wiejskich względna częstość zakażeń była nawet o 2,6% większa niż na terenach nawadnianych. Znacznie mniej (prawie o 80%) dodatnich wyników z terenów kontrolnych miejskich można by tłumaczyć zupełną odmiennością tego środowiska. Z wyników badań można wyprowadzić wniosek, że nawadnianie nie przedstawia większego niebezpieczeństwa. Oprócz drobnych ssaków zbadano 294 surowice zwierząt domowych, w tym 210 surowic bydła i 84 koni. Wyniki badań zwierząt domowych bytujących na tych terenach nie odbiegają od wyników z terenów kontrolnych.

4. Odrębne badania przeprowadzone na kilkuset małych ssakach nad nosicielstwem riketsji dały wynik negatywny.

5. Badania wirusologiczne, przeprowadzone przez Zakład Wirusologii Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN, przedstawiają się następująco: wykonano 2569 badań obejmując nimi 651 gryzoni i 45 próbek wód ściekowych. Od drobnych ssaków autorzy wyizolowali szczepy Coxsackie B_3, natomiast ze ścieków szczepów Adenowirusów B_{17} i Coxsackie B_3. Wykazano, że tylko w małym odsetku przypadków udaje się izolować szczepy z materiału pochodzącego od drobnych gryzoni lub z wód ściekowych. Jak podają autorzy, szczepy wyizolowane z wód ściekowych udawało się łatwiej utrzymać w dalszych pasażach i doprowadzić do ich określenia, natomiast hodowla szczepów wyizolowanych z gryzoni najczęściej urywała się po kilku pasażach. Wyizolowane szczepy Adenowirusów nie stanowią niebezpieczeństwa dla zdrowia publicznego. Wykrycie szczepów Coxsackie, ze względu na częste równoległe ich znajdowanie z wirusem *poliomyelitis*, może stanowić zjawisko niewskazane z punktu widzenia higienicznego, lecz jest to wirus mniej niebezpieczny, niż wirus porażenia dziecięcego. Wody ściekowe i drobne ssaki z terenów nawadnianych stanowią zatem w pewnym stopniu potencjalne niebezpieczeństwo dla ludzi. Zagadnienie to wymaga dalszych badań teoretycznych oraz bardzo szczegółowej obserwacji.

6. Jasińska z Katedry Mikrobiologii Weterynaryjnej przeprowadzała badania nad występowaniem *Listeria monocytogenes*, włoskowca różycy i baktofagów anty-*Listeria* u 383 drobnych ssaków z pól nawadnianych ściekami oraz w wodach ściekowych. W żadnym przypadku nie wykryto ani *L. monocytogenes* ani włoskowca różycy u drobnych ssaków. Z 78 próbek wody ściekowej wyizolowano 1 szczep *Listeria*, typ serologiczny *4b* oraz 2 szczepy bakteriofaga anty-*Listeria*

Wyizolowanie *L. monocytogenes* i fagów swoistych dla tej bakterii wskazuje na istnienie chorych lub nosicieli na danym terenie. Zachodzą duże trudności w ocenie niebezpieczeństwa, jakie przedstawiają ścieki pod tym względem. Na wyniki te jednakże należy zwrócić specjalną uwagę i prowadzić dalsze badania w tym kierunku.

7. Balicka i Sobieszczański z Katedry Mikrobiologii Rolnej WSR przeprowadzali badania nad wpływem niektórych roślin i ich mikroflory korzeniowej na *Escherichia coli*. Autorzy stwierdzają, że dookoła korzeni roślin motylkowych tworzyły się stale strefy pozbawione wzrostu *E. coli*. Kilka roślin trawiastych jedno- i wieloletnich dało wyniki niejednolite: wyraźne strefy zahamowania dookoła korzeni żyta i brak tych stref w wypadku owsa. Czynnikiem hamującym nie są wydaliny korzeniowe, lecz drobnoustroje żyjące w rizosferze badanych roślin. Najwięcej takich antagonistycznych w stosunku do *E. coli* bakterii wyizolowano z rizosfery koniczyny, lucerny i żyta. Wyniki tych badań wskazują, że drobnoustroje chorobotwórcze, które są na ogół bardziej wrażliwe na różne czynniki niż *E. coli*, przy zetknięciu się z antagonistycznym działaniem flory bakteryjnej rizosfery pewnych roślin mogą łatwiej ulec eliminacji niż pałeczka okrężnicy.

8. Badania parazytologiczne przeprowadzała Katedra Parazytologii Wydziału Weterynarii WSR. Dorosz badał pasożyty wewnętrzne drobnych ssaków pochodzących z terenów nawadnianych i kontrolnych w ciągu trzech lat. Badaniami objęto 509 drobnych ssaków, należących do 6 gatunków. Z ilości tej 380 pochodziło z terenów nawadnianych, a 129 — z kontrolnych. Stwierdzono nieznacznie wyższą ekstensywność inwazji pasożytniczej u drobnych ssaków żyjących na terenach nawadnianych (62,5%) niż u ssaków pochodzących z terenów kontrolnych (50,4%). Stwierdzono brak zasadniczych różnic w składzie gatunkowym dorosłych form tasiemców i nicieni. Zauważono natomiast dość znaczną różnicę w częstości występowania i składzie gatunkowym form larwalnych tasiemców. Na terenach nawadnianych pasożyty te występują u 7,09% ssaków, przy czym zidentyfikowano obecność 5 różnych gatunków. Na kontrolnych stwierdzono tylko 3 gatunki, u 3,2% zwierząt. Drobne ssaki polne mogą stanowić więc na terenach nawadnianych poważny rezerwuar form larwalnych tasiemców, a tym samym źródło inwazji dla zwierząt mięsożernych. Występują również pewne różnice w częstości występowania pasożytów krwi na niekorzyść terenów nawadnianych, czego nie można jednak wiązać z obecnością ścieków. Godny podkreślenia jest fakt niestwierdzenia u drobnych ssaków pochodzących z obydwu terenów form mięśniowych i jelitowych włośnia (*Trichinella spiralis*), czego można byłoby się spodziewać z uwagi na przedostawanie się do wód ściekowych odpływów z rzeźni, rakarni itp.

Problem opracowany przez Patyka dotyczył: 1. stopnia zarażenia miejskich wód ściekowych, łąk i pastwisk, 2. zarobaczenia bydła i owiec, 3. występowania i zarażenia ślimaka *Galba truncatula*.

W okresie dwu lat zbadano około 3700 litrów wód ściekowych. Stwierdzono, że wody miejskie zawierały prócz jajek robaków ludzkich również oocysty i jaja pasożytów zwierząt domowych (oocysty kokcydiów, jaja motylicy wątrobowej, tasiemców i nicieni). Najwięcej oocyst i jaj wykryto w surowych ściekach zmieszanych z wodami rzeźnianymi. Najczęściej znajdowano jaja *Ascaris lumbricoides*, *Trychurius sp.* i jaja *Strongylata*. Zarażenie poszczególnych typów ścieków przedstawiało się następująco: średnio 1 jajo na 6 litrów ścieków surowych zmieszanych z wodami rzeźnianymi, 14 litrów wód surowych bez ścieków rzeźnianych i 32 litry wód mechanicznie oczyszczanych.

Poddano również badaniu trawę z łąk i pastwisk nawadnianych wyłącznie oczyszczanymi mechanicznie ściekami zawierającymi wody rzeźniane, a dla celów porównawczych trawę z łąk i pastwisk nawadnianych wodami surowymi bez ścieków rzeźnianych. Ogółem wykonano 86 analiz (około 130 kg trawy łąkowej i pastwiskowej), które wykazały obecność małych ilości inwazyjnych larw pasożytów zwierząt przeżuwających, przy czym larwy te należały do 9 rodzajów. Najwięcej larw, tak pod względem ilościowym, jak i gatunkowym, zebrano z łąki nawadnianej ściekami oczyszczanymi. Badane tereny należy uznać za mało zarażone, za średnio zarażone uważa się bowiem takie, na których jeden kilogram trawy zawiera 400 larw inwazyjnych. Obserwacje nad bydłem (523 zwierzęta) przeprowadzono w okresie dwu lat. Zarobaczenie bydła wypasanego na pastwiskach i łąkach nawadnianych wodami ściekowymi było mniejsze niż zarobaczenie normalnych zwierząt rzeźnych. Procent zarobaczenia u pierwszych wynosił 35%, a u drugich 68%. Bydło pasące się na terenach nawadnianych oczyszczanymi mechanicznie ściekami uległo zarażeniu przede wszystkim nicieniami żołądkowo-jelitowymi, w mniejszym procencie motylicą wątrobową i tasiemcami, przy zupełnym braku nicieni płucnych.

Badania nad zarobaczeniem 22 owiec (jagniąt) przeprowadzono w okresie dwu lat. Owce w okresie wypasania były zdrowe z wyjątkiem jednej najmłodszej, która padła z powodu tasiemczycy.

Z przeprowadzonych badań wynika, że znaczny procent (19%) jaj pasożytów przepływa ściekami przez osadnik. Poważne niebezpieczeństwo dla hodowli bydła i owiec, zwłaszcza dla bardzo młodych zwierząt wypasanych na terenach irygowanych oczyszczanymi wodami z rzeźni, stanowiły jaja tasiemców. Jaja motylicy wątrobowej nie mogły odegrać poważniejszej roli jako czynnik patogenny w rozprzestrze-

nianiu się choroby motylicznej u przeżuwaczy, ponieważ tereny nawadniane są prawdopodobnie środowiskiem niekorzystnym dla życia ślimaka *Galba truncatula*.

Na podstawie powyższych wyników można wyprowadzić następujące wnioski: wobec wyizolowania takich drobnoustrojów jak prątek gruźlicy, pałeczka listerii, leptospir, wirusów Coxsackie i Adenowirusów tereny nawadniane winny być poddane dłuższej obserwacji. Niektóre ze znalezionych drobnoustrojów, jak prątek gruźlicy, leptospiry i adenowirusy są bardzo rozpowszechnione w przyrodzie, toteż ich obecność na terenach nawadnianych nie jest niespodzianką. Występowanie *Listeria* i wirusów Coxsackie wymaga natomiast szczegółowych badań. Działanie antagonistyczne mikroflory rizosfery roślin uprawnych odgrywa prawdopodobnie dużą rolę w niszczeniu zarazków chorobotwórczych przedostających się na tereny nawadniane. Zdrowotność zwierząt domowych na terenach nawadnianych jest podobna do zdrowotności zwierząt na terenach kontrolnych.

Godny podkreślenia jest fakt niewystępowania u drobnych ssaków form mięśniowych i jelitowych włośnia, mimo że do wód ściekowych przedostają się wody odpływowe z rzeźni i rakarni. Stwierdzono natomiast większą ilość form larwalnych tasiemców, mogących być źródłem inwazji dla zwierząt mięsożernych. Wyniki te wskazują na konieczność kontynuowania podobnych badań.

Adres autora:
Author's address:

Prof. dr J. Zwierz
Zakład Badań nad Leptospirozą
Instytutu Weterynarii
Wrocław, ul. Rodakowskiego 6

KOMUNIKAT KOMITETU MIKROBIOLOGICZNEGO POLSKIEJ AKADEMII NAUK

ROZSTRZYGNIĘCIE KONKURSU

rozpisanego w 1958 roku przez Komitet Mikrobiologiczny przy Wydziale II Polskiej Akademii Nauk i przez Polskie Towarzystwo Mikrobiologów na temat:

Zagadnienia z dziedziny metabolizmu drobnoustrojów

Komitet Mikrobiologiczny PAN i Polskie Towarzystwo Mikrobiologów na posiedzeniu plenum Komitetu Mikrobiologicznego PAN w dniu 15 IV 1961 r. po zapoznaniu się z opinią Sądu Konkursowego w składzie: prof. dr I. Chmielewska, prof. dr I. Mochnacka, prof. dr E. Mikulaszek, wyróżniły następujące prace:

I nagrodę w wysokości zł 7000 otrzymała dr F. Meisel-Mikołajczyk — Zakład Mikrobiologii Lekarskiej AM, Warszawa, za prace:

1. Polysaccharides isolated from *Clostridium perfringens* Type C.
2. Antigen composition of *Clostridium perfringens* strains causing food poisonings.
3. Polysaccharides isolated from *Clostridium perfringens* Type F.

II nagrodę w wysokości zł 5000 otrzymała dr D. Hulanicka — Instytut Matki i Dziecka, Warszawa, za pracę:

1. Badania nad obecnością enzymów cyklu pentozowego i glikolizy u maczugowców błonicy.

III nagrodę w wysokości zł 3000 otrzymała dr K. Michalska — Instytut Gruźlicy, Warszawa, za prace:

1. Zmiany czynności metabolicznych u prątków kwasoopornych pod wpływem streptomycyny.
2. Wrażliwość niektórych enzymów oddechowych na streptomycynę.
3. Interaction of streptomycin and dihydrostreptomycin with apo- and codehydrogenases.

Przewodniczący
Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów
(—)Prof. dr J. Brill

Przewodniczący
Komitetu Mikrobiologicznego PAN
(—) Prof. dr E. Mikulaszek

ROZSTRZYGNIĘCIE KONKURSU

rozpisanego w 1958 roku przez Komitet Mikrobiologiczny przy Wydziale II Polskiej Akademii Nauk i przez Polskie Towarzystwo Mikrobiologów na temat:

Zagadnienia indukowanej zmienności trwałej u drobnoustrojów

Komitet Mikrobiologiczny PAN i Polskie Towarzystwo Mikrobiologów na posiedzeniu plenum Komitetu Mikrobiologicznego PAN w dniu 15 IV 1961 r. po zapoznaniu się z opinią Sądu Konkursowego w składzie: prof. dr W. Gajewski, prof. dr W. Kunicki-Goldfinger, prof. dr H. Makower wyróżniły następujące prace:

Dwie I nagrody równorzędne w wysokości po zł 6000 otrzymali:

a) Zespół pracowników: prof. dr R. Pakuła — Zakład Mikrobiologii i Higieny AM i Państwowy Zakład Higieny, Warszawa, mgr E. Hulanicka-Bańkowska — Państwowy Zakład Higieny, Warszawa, W. Walczak — Państwowy Zakład Higieny, Warszawa, za prace:

1. Zastosowanie wyciągów *E. coli* do fotoreaktywacji uszkodzonego promieniowaniem transformującego *DNA*.
2. Transformation reaction between different species of Streptococci.
3. Sensitivity to ultraviolet of the streptomycin resistance activity in transforming *DNA*.
4. Photoreactivation of *UV* damaged streptomycin resistance marker.
5. Effect of *UV* irradiation on the streptomycin resistance marker in transforming principle.
6. Inhibition of transformation in *Streptococcus* by *DNA*.

b) Dr W. Dobrzański — Zakład Mikrobiologii i Higieny AM, Warszawa, za pracę:

1. Zachowanie się populacji gronkowców w buforze z dodatkiem i bez dodatku streptomycyny.

III nagrodę w wysokości zł 3000 otrzymała mgr I. Pietrzykowska — Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Warszawa, za prace:

1. The role of protein synthesis in the production of the lysogenic phage after *UV* induction.
2. Studies on the mechanism of *UV* induction of lysogenic phage.
3. Induction of the lysogenic phage by *R*-nase.

Przewodniczący
Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów
(—)Prof. dr J. Brill

Przewodniczący
Komitetu Mikrobiologicznego PAN
(—) Prof. dr E. Mikulaszek

WYJAŚNIENIE SĄDU KONKURSOWEGO

Sąd Konkursowy w składzie: prof. dr W. Gajewski, prof. dr Wł. Kunicki-Goldfinger, prof. dr H. Makower jednomyślnie zawnioskował: przyznanie I nagrody drowi W. Dobrzańskiemu, II nagrody — zespołowi pracowników z prof. drem R. Pakułą na czele, III nagrody — mgr I. Pietrzykowskiej. Wniosek Sądu Konkursowego został przez plenum Komitetu Mikrobiologicznego PAN w dniu 15 kwietnia 1961 przyjęty 15 głosami *za*, przy jednym wstrzymującym się, bez żadnego sprzeciwu, objawiającego się w głosowaniu.

Za Sąd Konkursowy:
prof. dr Wł. Kunicki-Goldfinger

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
Vol. X

SKOROWIDZ AUTORÓW
AUTHORS' INDEX

Balicka N. i Sobieszczański J.: Badania terenów nawadnianych ściekami pod względem higieniczno-sanitarnym. VIII. Wpływ korzeni niektórych roślin i ich mikroflory na *Escherichia coli* 469
Bałtowska Z. — patrz Skurska Z. i inni 457
Blechert A. — patrz Kaniuga B. 109
Bożko L., Cypryk-Ossowska K. i Krzysztofik B.: Mikroflora powietrza zakładów gastronomicznych i powietrza atmosferycznego miasta Warszawy (cz. I. Badania ilościowe) 307
Brzozowska M.: Fizyko-chemiczne właściwości dekstranu syntetyzowanego przez szczepy *Leuconostoc* różnego pochodzenia 205
Bujak S.: Wstępne badania nad syntezą karotenów przez różne szczepy drożdży *Rhodotorula* 403
Bujak S. i Dąbkowski W.: Rozkład kwasu jabłkowego przez drożdże *Schizosaccharomyces acidodevoratus* w różnych warunkach fermentacji 409
Cypryk-Ossowska K. — patrz Bożko L. i inni 307
Czapikówna A. — patrz Luchterowa A. i inni 417
Danilewicz K.: Badania nad zdolnością niektórych szczepów *Streptomyces* do wywoływania parcha zwykłego ziemniaka i buraka 287
Dąbkowski W. — patrz Bujak S. 409
Decowski M.: Wytwarzanie hialuronidazy przez włoskowce różycy. I. Niektóre właściwości enzymu 161
Drozdowicz A.: Badania nad rozkładem biomika przez mikobakterie z rodzaju *Sporocytophaga* 255
Drożańska D. — patrz Drożański W. 379
Drożański W.: Wpływ bakterii na kiełkowanie cyst ameb glebowych 147
Drożański W. i Drożańska D.: Bakterie martwe jako pokarm dla pełzaków 379
Dutkiewiczowa E. — patrz Luchterowa A. i inni 417
Fertig S.: Badania terenów nawadnianych ściekami pod względem higieniczno-sanitarnym. II. Badanie gryzoni pochodzących z pól nawadnianych wodami ściekowymi w kierunku obecności prątków gruźlicy 429
Fiuczek M.: Powstawanie długich komórek *Escherichia coli* pod wpływem kwasu β-indolooctowego i kwasu malonowego 335
Hałasa J.: Nowa metoda izolacji mutantów *Streptomyces* 389
Hierowski M.: Wpływ rybonukleazy na aktywację aminokwasów u *Escherichia coli K 12a* 371

Hierowski M. i Stolzmann Z.: Wpływ chloramfenikolu na aktywację aminokwasów u *Escherichia coli K 12a* 135
Horodko J., Mikiewicz B., Naimski K. i Zakrzewski K.: Wpływ jonów potasu i sodu na wytwarzanie toksyny błonniczej . . 141
Horodko J., Krassowska L., Naimski K. i Zakrzewski K.: Ciągła hodowla *Salmonella typhi* dla produkcji szczepionki przeciwdurowej 351
Jabłoński L. i Popławski S.: Badania nad kwasem dezoksyrybonukleinowym pałeczek *Brucella*. Wstępne próby transformacji 155
Jakubowska J. i Oberman H.: Wpływ *pH* i składników podłoża na przemianę gazową i tworzenie acetoiny przez *Streptococcus diacetilactis* 187
Janota-Bassalik L. i Pedyk D.: Zdolność do wykorzystania różnych źródeł węgla ze szczególnym uwzględnieniem glukozy przez *Flavobacterium extorquens* Bassalik 225
Janota-Bassalik L. i Pyrka K.: Optymalne warunki zużywania szczawianów przez *Flavobacterium extorquens* Bassalik 239
Jasińska S.: Badania terenów nawadnianych ściekami pod względem higieniczno-sanitarnym. V. Badania nad występowaniem *Listeria monocytogenes*, włoskowca różycy i bakteriofagów anty-*Listeria* u małych ssaków z pól nawadnianych ściekami oraz w ściekach 443
Jeljaszewicz J. — patrz Włodarczak K. 81
Kaniuga B. i Blechert A.: Próby bilansu sacharozy w fermentacji dekstranowej *Leuconostoc mesenteroides* szczepu *L* 109
Karczewska H. i Świeżyńska H.: *Torulopsis pinus var. albida* — nowa odmiana drożdży wyizolowana z brunatnej strupowatości topoli 199
Karmańska K. — patrz Zwierz J. 117
Karmańska K. — patrz Zwierz J. i inni 447
Kidankiewicz T. — patrz Skurska Z. i inni 457
Konarska D. — patrz Zwierz J. i inni 447
Kołaczkowski S., Kowalczyk J., Piotrowski Z. i Żukowski Z.: Chlorowanie ścieków w sanatoriach przeciwgruźliczych. II. Skuteczność chlorowania ścieków 181
Kosewska L.: Mikroflora niektórych przecierów i koncentratów pomidorowych produkowanych w Polsce. I. 211
Kowalczyk J. — patrz Kołaczkowski S. i inni 181
Krassowska L. — patrz Horodko J. i inni 351
Krzemieniewska H.: *Acrasieae*. Szkic monograficzny 3
Krzystofik B. — patrz Bożko L. i inni 307
Kulińska D.: Wpływ dżdżownic na mikroflorę gleb 339
Kunicki-Goldfinger Wł.: Bronisław Niklewski (1879-1961) jako mikrobiolog 123
Kunicki-Goldfinger Wł.: Enzymy adaptacyjne w przebiegu syntezy tryptofanu u *Escherichia coli* 129
Kurzepa H.: Wpływ kwasu pantotenowego na *Acetobacter xylinum* . . 323
Luchterowa A., Dutkiewicz E. i Czapikówna A.: Badania nad drobnoustrojami złóż zraszanych 417
Łobodzińska M. — patrz Skurska Z. i inni 457
Makower H. — patrz Skurska Z. i inni 457
Mikiewicz B. — patrz Horodko J. i inni 141
Myśków W.: Rozprzestrzenienie w rizosferze roślin uprawnych drobnoustrojów uruchomiających fosfor 93

Myśków W.: Wpływ bakterii rozpuszczających fosforany wapnia na udostępnienie fosforu roślinom 395
Naimski K. — patrz Horodko J. i inni 141
Naimski K. — patrz Horodko J. i inni 351
Niewiarowska J.: Morfologia i fizjologia promieniowców symbiotycznych *Hippophae* 271
Oberman H. — patrz Jakubowska J. 187
Ogielski L. i Zawadzki Z.: Badania terenów nawadnianych ściekami pod względem higieniczno-sanitarnym. III. Badania nad obecnością prątków gruźlicy w ściekach miejskich wykorzystywanych dla celów rolniczych 433
Pakuła R.: Analiza pokrewieństwa genetycznego w obrębie rodzaju *Streptococcus* i *Pneumococcus* metodą międzygatunkowej transformacji 249
Pedyk D. — patrz Janota-Bassalik L. 225
Piotrowski Z. — patrz Kołaczkowski S. i inni . 181
Popławski S. — patrz Jabłoński L. 155
Pyrka K. — patrz Janota-Bassalik L. . . . 239
Skurska Z., Łobodzińska M., Kidankiewicz T., Bałtowska Z. i Makower H.: Badania terenów nawadnianych ściekami pod względem higieniczno-sanitarnym. VII. Badania wirusologiczne ścieków i gryzoni z terenów nawadnianych wodami ściekowymi . 457
Sobieszczański J. — patrz Balicka N. 469
Stolzmann Z. — patrz Hierowski M. 135
Strzelczyk E.: Badania nad występowaniem niektorych grup „pokarmowych" i fizjologicznych bakterii w rizosferze i w glebie poza korzeniami
Strzelczyk E. — patrz Strzelczykowa A. 101
Strzelczykowa A. i Strzelczyk E.: Antagonistyczne oddziaływanie promieniowcow na azotobaktera i *Rhizobium* w zależności od różnych źródeł węgla i azotu w podłożu 101
Świeżyńska H. — patrz Karczewska H. . . . 199
Ugorski L.: Badania terenów nawadnianych ściekami pod względem higieniczno-sanitarnym IV. Badania fauny terenów nawadnianych ściekami w kierunku nosicielstwa salmoneli i shigeli . . 439
Wasilewska E. — patrz Zwierz J. i inni 447
Włodarczak K. i Jeljaszewicz J.: Badania nad koagulazami gronkowcowymi. IV. Zachowanie się gronkowców w normalnych surowicach bez dodatku i z dodatkiem wolnej koagulazy 81
Wierzbicki J.: Badania terenów nawadnianych ściekami pod względem higieniczno-sanitarnym. I. Znaczenie wykorzystania ścieków do nawadniania użytków rolnych i leśnych 425
Zakrzewski K. — patrz Horodko J. i inni 141
Zawadzki Z. — patrz Ogielski L. 433
Zwierz J. i Karmańska K.: Obserwacje nad występowaniem „gniazd lęgowych" w hodowlach leptospir 117
Zwierz J., Karmańska K., Konarska D. i Wasilewska E.: Badania terenów nawadnianych ściekami pod względem higieniczno-sanitarnym. VI. Badania fauny terenów nawadnianych w kierunku nosicielstwa leptospir 447
Zwierz J.: Badania terenów nawadnianych ściekami pod względem higieniczno-sanitarnym. Ogólna dyskusja 473
Żukowski Z. — patrz Kołaczkowski S. i inni . . . 181

SKOROWIDZ RZECZOWY
SUBJECT INDEX

Acetobacter xylinum, wpływ kwasu pantotenowego (H. Kurzepa) . . 323
Acetoina, tworzenie przez *Str. diacetilactis*, wpływ *pH* i składników podłoża (Jakubowska J. i Oberman H.) 187
Acrasieae, szkic monograficzny (Krzemieniewska H.) 3
Adaptacyjne enzymy w syntezie tryptofanu u *E. coli* (Kunicki-Goldfinger W.) 129
Aminokwasów aktywacja u *E. coli*, wpływ chloramfenikolu (Hierowski M. i Stolzmann Z.) 135
Aminokwasów aktywacja u *E. coli*, wpływ rybonukleazy (Hierowski M.) 371
Antagonizm, oddziaływanie promieniowców na azotobaktera i *Rhizobium* w zależności od różnych źródeł C i N (Strzelczyk A. i E.) . . . 101
Azotobakter i *Rhizobium*, antagonistyczne oddziaływanie promieniowców w zależności od źródła C i N (Strzelczyk A. i E.) 101
Bakterie, wpływ na kiełkowanie cyst ameb glebowych (Drożański W.) 147
Bakterie martwe jako pokarm pełzaków (Drożański W. i Drożańska D.) 379
Bakterie, fizjologiczne i pokarmowe grupy, występowanie w rizosferze i w glebie poza korzeniami (Strzelczyk E.) 169
Bakterie rozpuszczające fosforany, wpływ na udostępnienie fosforu roślinom (Myśków W.) 295
Bakteriofagi anty-*Listeria*, występowanie w ściekach (Jasińska S.) . 443
Błonnika rozkład przez *Sporocytophaga* (Drozdowicz A.) 255
Błonicza toksyna, zależność wytwarzania od jonów potasu i sodu (Horodko J. i inni) 141
Brucella, badania nad *DNA* i próby transformacji (Jabłoński L. i Popławski S.) 155
Buraka parch, zdolność niektórych szczepów *Streptomyces* do wywoływania (Danilewicz K.) 287
Chlormafenikol, wpływ na aktywację aminokwasów u *E. coli* (Hierowski M. i Stolzmann Z.) 135
Chlorowanie ścieków w sanatoriach p-gruźliczych (Kołaczkowski S. i inni) 181
Dekstran syntetyzowany przez różne szczepy *Leuconostoc*, właściwości fizyko-chemiczne (Brzozowska M.) 205
Dekstranowa fermentacja *Leuconostoc*, próba bilansu sacharozy (Kaniuga B. i Blechert A.) 109
Drobnoustroje uruchamiające fosfor, rozprzestrzenienie w rizosferze roślin (Myśków W.) 93
DNA u pałeczek *Brucella*, próby transformacji (Jabłoński L. i Popławski S.) 155
Drożdże, *Rhodotorula*, wytwarzanie karotenów (Bujak S.) 403
Drożdże, *Schizosaccharomyces acidodevoratus*, rozkład kwasu jabłkowego (Bujak S. i Dąbkowski W.) 409
Dżdżownica, wpływ na mikroflorę gleb (Kulińska D.) 339
Enzymy adaptacyjne w syntezie tryptofanu u *E. coli* (Kunicki-Goldfinger W.) 129

Escherichia coli, powstawanie długich komórek pod wpływem *IAA* i kwasu malonowego (Fiuczek M.) 335
Escherichia coli, enzymy adaptacyjne w syntezie tryptofanu (Kunicki-Goldfinger W.) 129
Escherichia coli, wpływ chlormafenikolu na aktywację aminokwasów (Hierowski M. i Stolzmann Z.) 135
Escherichia coli, wpływ rybonukleazy na aktywację aminokwasów (Hierowski M.) 371
Escherichia coli, wpływ korzeni niektórych roślin i ich mikroflory (Balicka N. i Sobieszczański J.) 469
Flavobacterium extorquens, zdolność do wykorzystania różnych źródeł węgla (Janota-Bassalik L. i Pedyk D.) 225
Flavobacterium, optymalne warunki zużywania szczawianów (Janota-Bassalik L. i Pyrka K.) 239
Gleba, wpływ dżdżownic na mikroflorę (Kulińska D.) 339
Gleba, wpływ bakterii na kiełkowanie cyst ameb (Drożański W.) . . 147
Gleba, poza korzeniami i rizosferą, występowanie różnych grup bakterii (Strzelczyk E.) 169
Gronkowce, wzrost w normalnej surowicy z dodatkiem i bez dodatku wolnej koagulazy (Włodarczak K. i Jeljaszewicz J.) 81
Gruźlicy prątki, występowanie w ściekach (Ogielski L. i Zawadzki Z.) 433
Gruźlicy prątki, występowanie u małych ssaków z terenów nawadnianych ściekami (Fertig S.) 429
Gryzonie z terenów nawadnianych ściekami, zakażenie prątkami (Fertig S.) 429
Gryzonie z terenów nawadnianych ściekami, badania wirusologiczne (Skurska Z. i inni) 457
Hialuronidaza włoskowców różycy, właściwości enzymu (Decowski M.) 161
Hippophae, morfologia i fizjologia promieniowców symbiotycznych (Niewiarowska J.) 271
Hodowla ciągła *S. typhi* dla produkcji szczepionki (Herodko J. i inni) 351
β-indolooctowy kwas, powstawanie form długich u *E. coli* (Fiuczek M.) 335
Jabłkowy kwas, rozkład przez *Schizosaccharomyces acidodevoratus* w różnych warunkach (Bujak S. i Dąbkowski W.) 409
Karoteny, tworzenie przez *Rhodotorula* (Bujak S.) 403
Koagulaza wolna, wpływ na wzrost gronkowców w surowicy (Włodarczak K. i Jeljaszewicz J.) 81
Korzenie roślin, wpływ na *E. coli* (Balicka N. i Sobieszczański J.) 469
Leptospira, występowanie u zwierząt z terenów nawadnianych ściekami (Zwierz J. i inni) 447
Leptospira, występowanie „gniazd lęgowych" w hodowli (Zwierz J. i Karmańska K.) 117
Leuconostoc, właściwości dekstranu wytwarzanego przez szczepy różnego pochodzenia (Brzozowska M.) 205
Leuconostoc, próby bilansu sacharozy w fermentacji dekstranowej (Kaniuga B. i Blechert A.) 109
Listeria monocytogenes i fag specyficzny, występowanie w ściekach i małych ssakach z terenów nawadnianych (Jasińska S.) 443
Mikroflora przecierów pomidorowych i koncentratów (Kosewka L.) . 211
Mikroflora gleby, wpływ dżdżownic (Kulińska D.) 339
Mikroflora powietrza zakładów gastronomicznych (Bożko L. i inni) 307
Mutanty *Streptomyces*, metoda otrzymywania (Hałasa J.) 389

Malonowy kwas, powstawanie form długich u *E. coli* (Fiuczek M.) . . 339
Miksobakterie, rozkład błonnika przez *Sporocytophaga* (Drozdowicz A.) 255
Niklewski Bronisław (1879-1961) jako mikrobiolog (Kunicki-Goldfinger W.) 123
Pantotenowy kwas, wpływ na *A. xylinum* (Kurzepa H.) 323
Parch zwykły ziemniaka, zdolność do wywoływania parcha przez *Streptomyces* (Danilewicz K.) 287
Pełzaki glebowe, wpływ bakterii na kiełkowanie cyst (Drożański W.) 147
Pełzaki, bakterie martwe jako pokarm (Drożański W. i Drożańska D.) 379
Pneumococcus i *Streptococcus*, analiza pokrewieństwa metodą transformacji międzygatunkowej (Pakuła R.) 249
Potasu jony, wpływ na wytwarzanie toksyny błonniczej (Horodko J. i inni) 141
Powietrze, badania mikroflory (Bożko L. i inni) 307
Prątki gruźlicy, występowanie w ściekach (Ogielski L. i Zawadzki S.) 433
Prątki gruźlicy, występowanie u gryzoni z terenów nawadnianych (Fertig S.) 429
Promieniowce, antagonistyczne oddziaływanie na azotobaktera i *Rhizobium* (Strzelczykowa A. i Strzelczyk E.) 101
Promieniowce, symbiotyczne *Hippophae* (Niewiarowska J.) 271
Promieniowce, patrz też *Streptomyces*
Rhizobium i azotobakter, antagonistyczny wpływ promieniowców (Strzelczykowa A. i Strzelczyk E.) 101
Rhodotorula, synteza karotenów (Bujak S.) 403
Rizosfera, występowanie niektórych grup pokarmowych i fizjologicznych bakterii (Strzelczyk E.) 169
Rizosfera, niektórych roślin, oddziaływanie na *E. coli* (Balicka N. i Sobieszczański J.) 469
Rizosfera roślin uprawnych, rozprzestrzenienie drobnoustrojów uruchomiających fosfor (Myśków W.) 93
Rybonukleaza, wpływ na aktywację aminokwasów u *E. coli* (Hierowski M.) 371
Salmonella typhi, hodowla ciągła dla produkcji szczepionki (Horodko J. i inni) 351
Salmoenella, występowanie u małych ssaków z terenów nawadnianych ściekami (Ugorski L.) 439
Schizosaccharomyces acidodevoratus, rozkład kwasu jabłkowego (Bujak S. i Dąbkowski W.) 409
Shigella, występowanie u małych ssaków z terenów nawadnianych ściekami (Ugorski L.) 439
Sód, wpływ na tworzenie toksyny błoniczej (Horodko J. i inni) . . 141
Sporocytophaga, rozkład błonnika (Drozdowicz A.) 25
Streptococcus i *Pneumococcus*, analiza pokrewieństwa metodą transformacji międzygatunkowej (Pakuła R.) 249
Streptococcus diacetilactis, wpływ *pH* i podłoża na przemianę gazową i wytwarzanie acetoiny (Jakubowska J. i Oberman H.) 187
Streptomyces, zdolność do wywoływania parcha zwykłego ziemniaka i buraka (Danilewicz K.) 287
Streptomyces, metoda otrzymywania mutantów (Hałasa J.) 389
Szczawiany, zdolność wykorzystania przez *Flavobacterium extorquens* (Janota-Bassalik L. i Pyrka K.) 225

Szczepionka przeciwdurowa, zastosowanie hodowli ciągłej *S. typhi* (Horodko J. i inni) 351
Ścieki sanatoriów przeciwgruźliczych, skuteczność chlorowania (Kołaczkowski S. i inni) 181
Ścieki, wykorzystanie do nawadniania użytków rolnych (Wierzbicki J.) 425
Ścieki, występowanie prątków gruźlicy (Ogielski L. i Zawadzki Z.) 433
Ścieki, występowanie *L. monocytogenes*, włoskowca różycy i faga anty-*Listeria* w ściekach (Jasińska S.) 443
Ścieki, badania wirusologiczne (Skurska Z. i inni) 457
Ścieki, badania higieniczno-sanitarne ścieków wykorzystywanych dla celów rolniczych (Zwierz J.) 473
Toksyna błonnicza, wpływ potasu i sodu na jej wytwarzanie (Horodko J. i inni) 141
Torulopsis pinus var. albida, nowa odmiana drożdży z brunatnej strupowatości topoli (Karczewska H. i Świeżyńska H.) 199
Transformacja międzygatunkowa u *Streptococcus* i *Pneumococcus* (Pakuła R.) 249
Transformacja u *Brucella* (Jabłoński L. i Popławski S.) . . . 155
Tryptofanu synteza u *E. coli*, enzymy adaptacyjne (Kunicki-Goldfinger W.) 129
Wirusologiczne badania ścieków i małych ssaków z terenów nawadnianych ściekami (Skurska Z. i inni) 457
Włoskowiec różycy, właściwości hialuronidazy (Decowski M.) . 161
Włoskowiec różycy, występowanie w ściekach i małych ssakach z terenów nawadnianych (Jasińska S.) 443
Ziemniaka parch zwykły, wywoływanie przez *Streptomyces* (Danilewicz K) 287
Złoża zraszane, mikroflora i mikrofauna (Luchterowa A. i inni) 417

SPIS TREŚCI — CONTENTS

1. Janina Horodko, Ligia Krassowska, Krzysztof Naimski i Kazimierz Zakrzewski: Ciągła hodowla *Salmonella typhi* dla produkcji szczepionki przeciwdurowej
Continuous culture of *Salmonella typhi* as a method for production of vaccine 351
2. Marian Hierowski: Wpływ rybonukleazy na aktywację aminokwasów u *Escherichia coli K 12a*
Influence of ribonuclease on aminoacids activation in *Escherichia coli K-12a* 371
3. Wincenty Drożański and Danuta Drożańska: Dead bacteria as food for amoebae
Bakterie martwe jako pokarm dla pełzaków 379
4. Józef Hałasa: Nowa metoda izolacji mutantów *Streptomyces*. Doniesienie I
A new method for the isolation of mutants of *Streptomyces* . . . 387
5. Władysław Myśków: The influence of bacteria dissolving phosphates on the availability of phosphorus to plants
Wpływ bakterii rozpuszczających fosforany wapnia na udostępnianie fosforu roślinom 395
6. Stanisław Bujak: Wstępne badania nad syntezą karotenów przez różne szczepy drożdży *Rhodotorula*
Preliminary studies on carotene synthesis by different strains of *Rhodotorula* 403
7. Stanisław Bujak i Wiesław Dąbkowski: Rozkład kwasu jabłkowego przez drożdże *Schizosaccharomyces acidodevoratus* w różnych warunkach fermentacji
Decomposition of malic acid by *Schizosaccharomyces acidodevoratus* under different fermentation conditions 409
8. Anna Luchterowa, Elżbieta Dutkiewiczowa and Anna Czapikówna: Investigations on microorganisms in trickling filters
Badania nad drobnoustrojami złóż zraszanych 417
Badania terenów nawadnianych ściekami pod względem higieniczno-sanitarnym
Area irrigated with sewage. Its hygienic and sanitary evaluation 423
9. Jan Wierzbicki: I. Znaczenie wykorzystania ścieków do nawadniania użytków rolnych i leśnych
I. The role of irrigation with sewage in agriculture and forestry . 425

10. Stanisław Fertig: II. Badanie gryzoni pochodzących z pól nawadnianych wodami ściekowymi w kierunku obecności prątków gruźlicy
II. Mycobacteria in rodents from irrigated area 429
11. Lesław Ogielski i Zdzisław Zawadzki: III. Badania nad obecnością prątków gruźlicy w ściekach miejskich wykorzystywanych dla celów rolniczych
III. Occurrence of tubercle bacilli in urban sewage used for land irrigation 433
12. Leopold Ugorski: IV. Badania fauny terenów nawadnianych ściekami w kierunku nosicielstwa salmoneli i shigeli
IV. Investigation on *Salmonella* and *Shigella* infection in rodents from irrigated area 439
13. Stanisława Jasińska: V. Badania nad występowaniem *Listeria monocytogenes*, włoskowca różycy i bakteriofagów anty-*Listeria* u małych ssaków z pól nawadnianych ściekami oraz w wodach ściekowych
V. Occurrence of *Listeria monocytogenes*, *Erysipelothrix rhusiopathiae* and bacteriophages anti-*Listeria* in small mammalia from irrigated area and in sewage 443
14. Józef Zwierz, Krystyna Karmańska, Danuta Konarska i Eleonora Wasilewska: VI. Badania fauny terenów nawadnianych w kierunku nosicielstwa leptospir w latach 1957—1959
VI. *Leptospira* infection in animals from irrigated area 447
15. Zofia Skurska, Marianna Łobodzińska, Tadeusz Kidankiewicz, Zofia Bałtowska i Henryk Makower: VII. Badania wirusologiczne ścieków i gryzoni z terenów nawadnianych wodami ściekowymi
VII. Virological study of sewage and rodents from irrigated area . 457
16. Natalia Balicka i Jerzy Sobieszczański: VIII. Wpływ korzeni niektórych roślin i ich mikroflory korzeniowej na *Escherichia coli*
VIII. Effect of roots of some crop plants and their rhizosphere microflora on *Escherichia coli* 469
17. Józef Zwierz: Ogólna dyskusja
General Discussion 473
18. Komunikat Komitetu Mikrobiologicznego Polskiej Akademii Nauk . . 479
Wyjaśnienie sądu konkursowego 480
19. Skorowidz autorów — Authors' index, Vol. X. 481
20. Skorowidz rzeczowy — Subject index, Vol. X. 484

Warunki prenumeraty kwartalnika

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA

Cena w prenumeracie zł 100,— rocznie

zł 50,— półrocznie

Zamówienia i wpłaty przyjmują:

1. Przedsiębiorstwo Upowszechniania Prasy i Książki „Ruch" Wrocław, ul. Oławska 10/11, konto PKO nr 8-6-13768
2. Urzędy pocztowe
3. Księgarnie „Domu Książki"

Prenumerata ze zleceniem wysyłki za granicę 40% drożej. Zamówienia dla zagranicy przyjmuje Przedsiębiorstwo Kolportażu Wydawnictw Zagranicznych „Ruch". Warszawa, ul. Wilcza 46, konto PKO nr 1-6-100-024.

Bieżące numery do nabycia w księgarniach naukowych „Domu Książki" oraz w Ośrodku Rozpowszechniania Wydawnictw Naukowych Polskiej Akademii Nauk — Wzorcownia Wydawnictw Naukowych PAN — Ossolineum — PWN, Warszawa, Pałac Kultury i Nauki (wysoki parter).

Tylko prenumerata zapewnia regularne otrzymywanie czasopisma

Redakcja zawiadamia P. T. Czytelników, że już od dnia 15 XI 1961 r. można zamawiać prenumeratę czasopism na rok 1962

Cena zł 25,—

Wydawane z zasiłku
POLSKIEJ AKADEMII NAUK